

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER HUMANEN
BETA-DEFENSINE -1, -2 UND -3
(HBD -1, -2 UND -3) IN HUMANEM KNOCHEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde
eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
SYLVANA DÄBEL
aus Kyritz

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. Warnke, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2010

Zum Druck
genehmigt, Kiel, den 26.04.2010

gez. _____

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	
2.1. Material.....	8
2.2. Methoden	
2.2.1. Schnittvorbereitung zur Färbung.....	9
2.2.2. Schnittfärbung.....	11
2.3. Auswertungsverfahren	
2.3.1. Semiquantitative Analyse.....	14
2.3.2. Verwendete Analysegeräte.....	14
3. Ergebnisse	
3.1. Kontrollen.....	15
3.2. Immunhistochemische Auswertung	
3.2.1. Infizierter humaner Unterkieferknochen.....	16
3.2.2. Nicht infizierter humaner Unterkieferknochen.....	19
3.2.3. Nicht infizierter humaner Beckenknochen (Crista iliaca).....	23
3.2.4. Nicht infizierter humaner Scapulaknochen.....	25
3.2.5. Nicht infizierter humaner Fibulaknochen.....	28
3.3. Semiquantitative Analyse.....	31
4. Diskussion	34
5. Zusammenfassung	39
6. Literaturverzeichnis	41
7. Danksagung	47
8. Lebenslauf	48

1. Einleitung

Einfache mund-, kiefer- und gesichtschirurgische Eingriffe, wie Zahnextraktionen oder operative Zahnfreilegungen, führen auch ohne prophylaktische Antibiose nur selten zur Knocheninfektion, obwohl der Kieferknochen während der Operation immer mit Mundhöhlenflora kontaminiert wird. Auch kleine Operationen bei der Parodontaltherapie, wie beispielsweise Lappenoperationen, führen trotz großer Bakterienbesiedlung nur selten zu größeren Knocheninfektionen. Bei prothetisch indizierten Eingriffen, wie zum Beispiel der chirurgischen Kronenverlängerung, kommen der freigelegte Alveolarknochen und das umliegende Gewebe ebenfalls in Kontakt mit der Mundhöhlenflora. Auch dort tritt in den meisten Fällen eine gute Heilung ein. Des Weiteren weisen kleine Kinder sowohl während der ersten als auch während der zweiten Dentition nur selten orale Infektionen im Bereich des Alveolarknochens auf.

Im Allgemeinen kann humaner Knochen frei transplantiert werden. Er hat regenerative Fähigkeiten und gilt als anpassungsfähiges Gewebe. So können Endoprothesen, perkutane Drahtpins oder Implantate in den Knochen integriert werden (Springer et al. 2002, Artico et al. 2003, Warnke et al. 2004). In der orthopädischen Chirurgie sind perioperative systemische Antibiosen zwar obligat, das Infektionsrisiko kann aber heute in Grenzen gehalten werden, so dass die Einbringung von alloplastischen Materialien in den Knochen zum klinischen Alltag gehört (Giulieri et al. 2004).

Der Kieferknochen im Speziellen scheint in diesem Zusammenhang eine besondere Infektionsresistenz aufzuweisen. Beachtenswert ist dies, da der orale Knochen schon unter physiologischen Bedingungen mit Mundhöhlenflora kontaminiert wird, die ein breites Spektrum aerober und anaerober Mischflora mit etwa 200 verschiedenen Keimarten, darunter teilweise hochvirulente Keime, aufweist (Halling und Merten 1992, Müller 2006). So zeigten Teltzrow et al., dass nach circa 1200 bilateralen Osteotomien ohne perioperativer Antibiose nur wenige Patienten postoperative Infektionen aufwiesen (Teltzrow et al. 2005). Dies korreliert mit den Ergebnissen um Kramer et al., welche belegen, dass bei circa 1000 LeFort I Osteotomien ohne perioperativer Antibiose nur wenige Patienten von Infektionen betroffen waren (Kramer et al. 2004).

Wie bereits erwähnt, können Zähne ohne prophylaktische Antibiose aus dem Knochen extrahiert oder operativ freigelegt werden. Ebenfalls können Zahnimplantate gesetzt werden und transgingival einheilen (Brånemark 1985, Davies 1998). Die Parodontitis stellt einen oft langjährigen Infektionsprozess im direkten Kontakt zum Alveolarknochen dar, ohne dass der gesamte Kiefer infiziert wird (Müller 2006). Kieferknochen kann devitale Zähne mit keimbeladenen apikalen Granulomen über lange Zeiträume schadlos tolerieren, bis dann plötzlich die Abwehrfähigkeit des Knochens nicht mehr ausreicht, und ein odontogener Abszess entsteht.

Diese Beobachtungen haben uns bewogen, ein bisher unentdecktes Immunsystem im Knochen, basierend auf antimikrobiellen Peptiden, zu vermuten, das für eine hinreichende Resistenz des Knochens gegen bakterielle Invasion verantwortlich ist und das bekannte adaptive Immunsystem des Körpers unterstützt.

Antimikrobielle Peptide sind Eiweißmoleküle, die von höheren Lebewesen selbst produziert werden. Sie besitzen Eigenschaften, die denen von Antibiotika gleichen. Sie sind somit in der Lage, einen gewissen Schutz vor bakteriellen Infektionen zu gewährleisten. Chemisch hergestellte Antibiotika werden schon seit vielen Jahren beim Kampf gegen bakterielle Infektionen wirksam eingesetzt. Heutzutage hat die Medizin allerdings zunehmend mit Resistenzen, vor allem gegen Penizillin, zu kämpfen. Daher bietet sich eine genaue Erforschung der antimikrobiellen Peptide an, um bestehenden Resistenzen und neuen Resistenzbildungen entgegenwirken zu können.

Antimikrobielle Peptide wurden erstmals 1981 auf epithelialen Zelloberflächen entdeckt und können die Invasion von Mikroorganismen abwehren (Steiner et al. 1981). Sie ergänzen die natürliche Barrierefunktion des Epithels (Boman 2003). Seither wurden antimikrobielle Peptide zur Abwehr von Mikroorganismen auf Epithelien der Haut und Schleimhäute von Menschen, Tieren und Pflanzen beschrieben (Boman et al. 1991, Lehrer et al. 1991, Zhao et al. 1996, J. Harder et al. 1997 a, J.R. Garcia et al. 2001 a).

In der internationalen Datenbank für antimikrobielle Peptide in Trieste, Italien, waren am 1. November 2004 circa 880 entschlüsselte antimikrobielle Peptide auf eukaryonten Zellen der Fauna und Flora beschrieben (Abbildung 1).

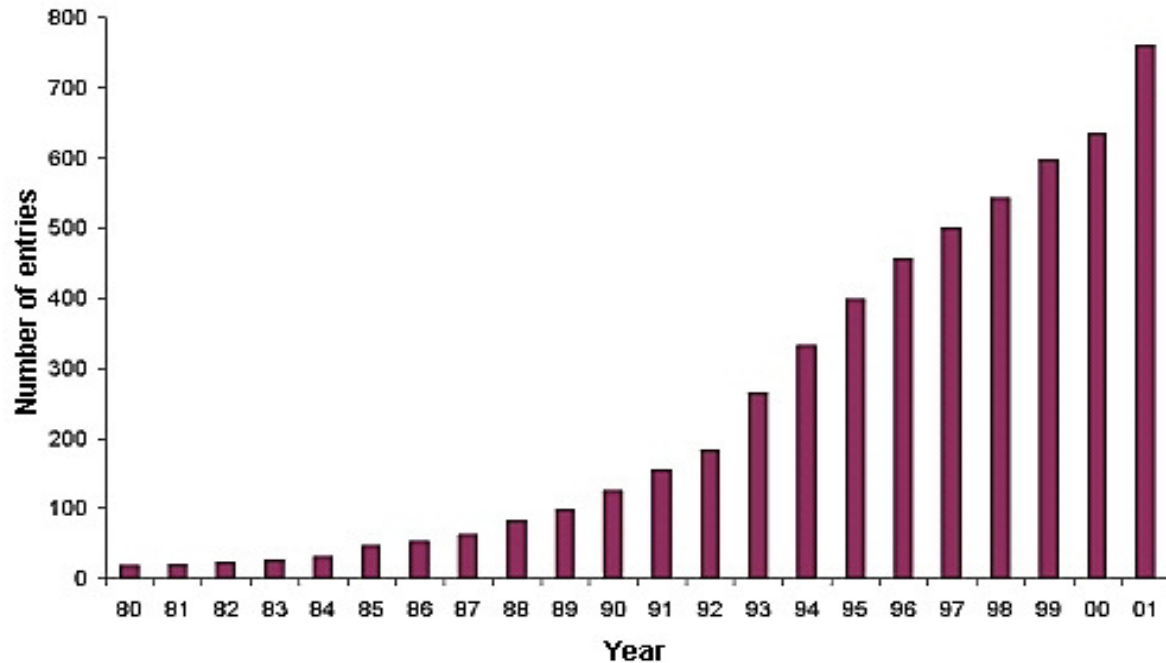


Abbildung 1: Anzahl der antimikrobiellen Peptide

Dargestellt ist die Anzahl der entschlüsselten antimikrobiellen Peptide von eukaryonten Zellen aus Tier und Pflanzenwelt seit 1980.

(<http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm>)

Im September 2003 haben Wang und Wang erstmals eine Veröffentlichung über die Antimicrobial Peptide Database des Nebraska Medical Center in Omaha, USA, herausgebracht (Wang und Wang 2004). Aktualisiert wurde diese Datenbank im Januar 2009 ebenfalls von Wang et al. In diesem Artikel wird nun von insgesamt 1228 antimikrobiellen Peptiden gesprochen (Wang et al. 2009). In knappen vier Jahren wurden also rund 400 neue körpereigene Antibiotika erforscht.

Die Funktionsweise der antimikrobiellen Peptide ist noch unklar. Es wird vermutet, dass einige Peptide - ähnlich wie β -lactam Antibiotika - die Membranen der bakteriellen Invasoren perforieren beziehungsweise zerstören können (Steiner et al. 1981, Wimley et al. 1994, Shai 2002, Zasloff 2002, Boman 2003, Abbildung 2). Solch ein System der bakteriellen Abwehr wäre ideal für oralen Knochen, um die orale Flora bei Kontakt abzuwehren. Dies könnte die Infektionsresistenz von oralem Knochen unter normalen, gesunden Umständen erklären.

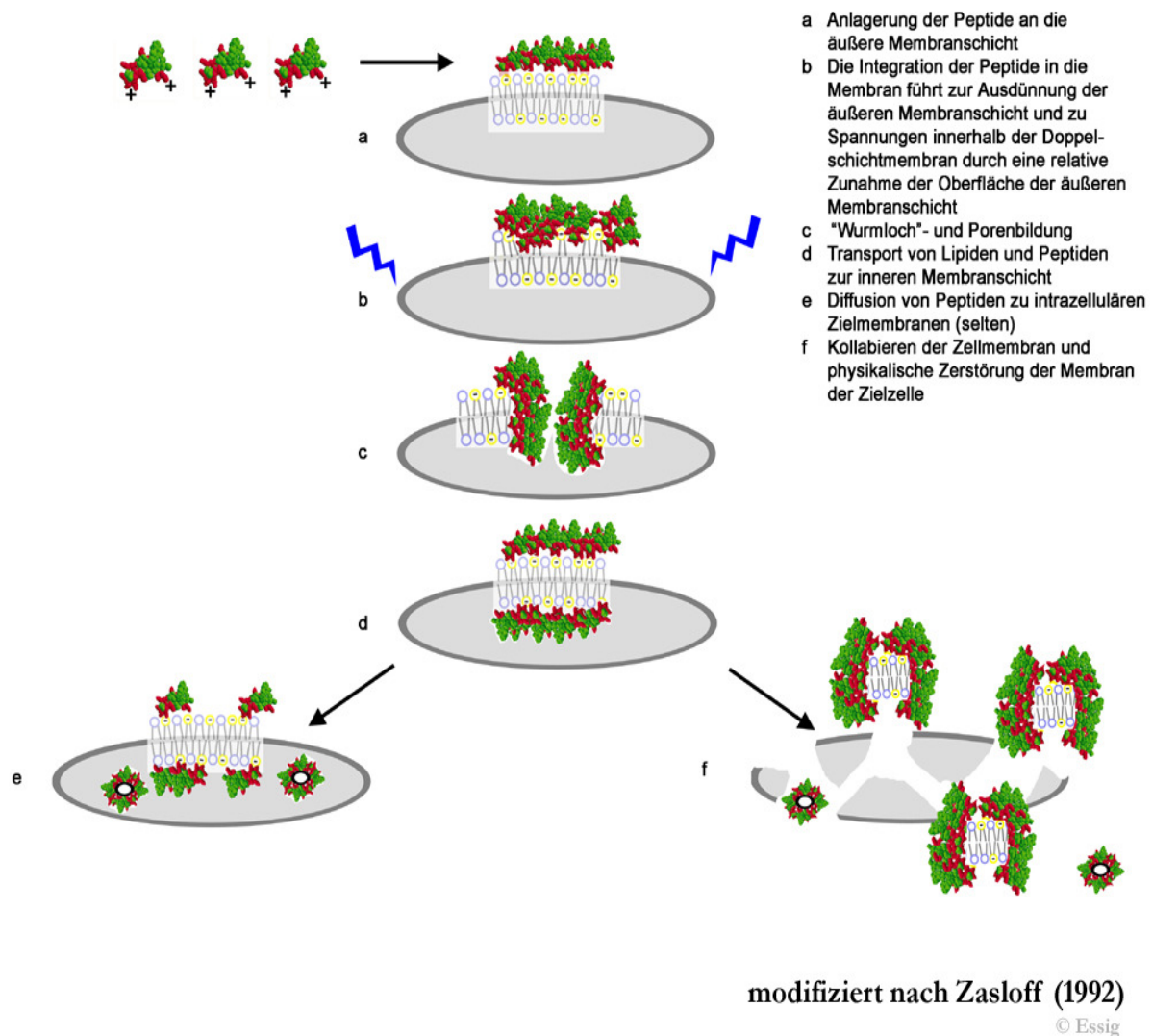


Abbildung 2: Theorie zum Wirkungsmechanismus antimikrobieller Peptide an epithelialen Oberflächen (Zasloff 2002)

Die Peptide lagern sich zunächst an die Bakterienmembran an, um dann durch Porenbildung die Membranintegrität zu zerstören, welches zum Tod des Bakteriums führt.

In der großen und stetig wachsenden Gruppe der antimikrobiellen Peptide bilden die Defensine eine eigenständige Familie. Beim Menschen sind bisher sechs Alpha Defensine (die Humanen Neutrophilen Defensine HNP 1-4 sowie die Humanen Defensine HD 5-6) und vier Beta Defensine (HBD 1-4) bekannt (Yang et al. 2001). Des Weiteren wurden in den Leukocyten von Rhesusaffen die von den Alpha Defensinen abgeleiteten θ -Defensine (RTD 1-3) nachgewiesen. Diese werden zwar im menschlichen Knochenmark kodiert, sie werden jedoch durch ein Stopcodon an ihrer endgültigen Expression im Menschen gehindert und gelten daher als Pseudogene (Selsted 2004, Lehrer 2004). Die Gene, die sowohl für die humanen Alpha- als auch Beta-Defensine kodieren, wurden auf dem Chromosom 8p23

nachgewiesen. Das Genom ist dabei zu einem 450-kb Segment zusammengebündelt (Linzmeier et al. 1999).

Die Alpha Defensine wurden in der Granula von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen, sowie in den Panethzellen des Dünndarms und den Epithelzellen des weiblichen Urogenitaltraktes (Quayle et al. 1998). Die Entdeckung der Beta Defensine wurde erstmals 1993 von Selsted et al. beschrieben (Selsted et al. 1993). Sie wurden bis heute in verschiedenen Epithelien der Haut, dem Respirationstrakt, dem Urogenitaltrakt sowie in Gelenkflüssigkeit nachgewiesen (Bensch et al. 1995, Fulton et al. 1997, Goldman et al. 1997, Valore et al. 1998, O'Neil et al. 1999, Harder et al. 2001, Varoga et al. 2005).

Bei diesen humanen Beta Defensinen handelt es sich um kationische Peptide mit einer Aminosäuresequenz von 25 – 45 Aminosäuren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sechs Cysteine drei Disulfidbrücken zur Stabilisierung ausbilden (Epand und Vogel 1999). Alle vier humanen Beta Defensine unterscheiden sich voneinander nur durch geringe Unterschiede in ihrer Wirkungsweise und in ihrem Aufbau. So ist die Aminosäuresequenz von hBD-1 beispielsweise um drei Aminosäuren am N-Terminus und einer Aminosäure am C-Terminus kürzer als die von hBD-2. Als Isoformen wurden die Defensine hBD-5 sowie hBD-6 im Nebenhoden entdeckt (Yamaguchi et al. 2002).

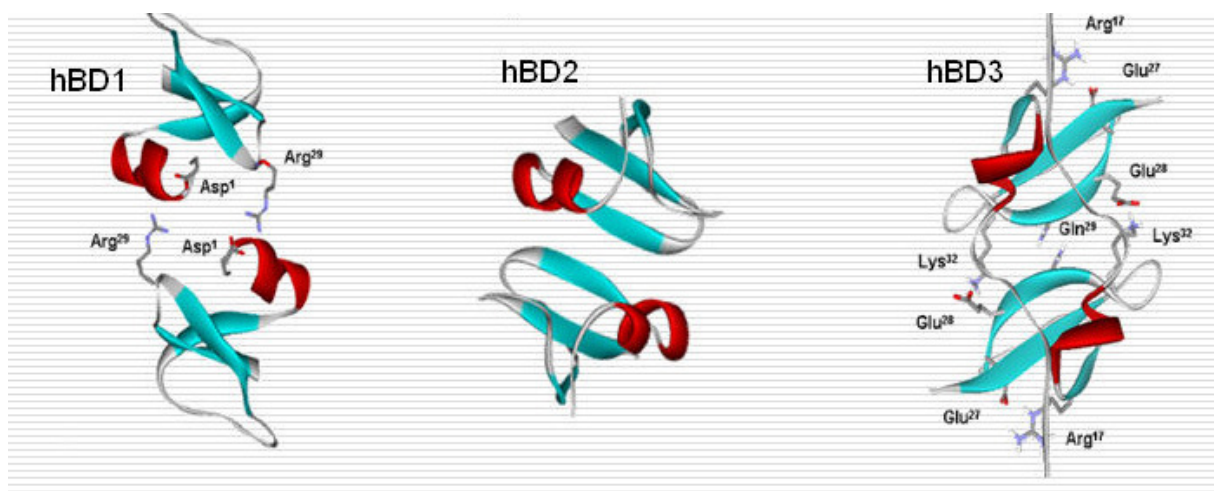


Abbildung 3: Darstellung der Struktur der humanen Beta Defensine -1 -2 und -3
 Alle weisen eine antiparallele β -Faltblattstruktur und eine α -Helix auf.
 Die genaue Struktur des Defensins hBD-4 ist noch unbekannt.
 (Tossi 2002)

Allgemein haben die Defensine eine antimikrobielle Wirkung auf grampositive sowie gramnegative Bakterien (*E.coli*), aber auch gegen Pilze (*Candida albicans*) und Viren (Adenoviren) (Lehrer und Ganz 1996, J. Harder et al. 1997 b, Gropp et al. 1999, Hoover et al. 2000, Hoover et al. 2003).

Die Defensine hBD-1 und hBD-3 haben eine antimikrobielle Wirkung sowohl gegen gramnegative Bakterien als auch gegen grampositive Bakterien. HBD-1, -2 sowie -4 werden allerdings schnell durch Salze inaktiviert; hBD-3 hingegen durch Kortikosteroide (Duits et al. 2001).

HBD-2 hat nur eine geringe bis keine Wirkung auf grampositive Bakterien. Stattdessen wirkt es gegen gramnegative Bakterien und Pilze (*Candida albicans*) (Singh et al. 1998). Es wurde auch beschrieben, dass es eine zehn Mal stärkere Wirkung gegen *E.coli* hat als hBD-1 (Singh et al. 1998). HBD-4 findet sich in den Nieren, Lungen, sowie den Hoden, dem Uterus und der Schilddrüse. Es zeigt als einziges der Defensine eine sehr starke Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa* (J. R. Garcia et al. 2001 b). Es wirkt dagegen aber schwächer gegen gramnegative sowie grampositive Bakterien (J. R. Garcia et al. 2001 b).

Interessant ist, dass in Epithelien ebenfalls die lokale Induktion und Hochregulation der Expression von antimikrobiellen Peptiden entdeckt wurde. Die Induktion geschieht bei Kontakt mit Mikroorganismen (Lehrer und Ganz 1996) und insbesondere durch die Interleukine IL-1 α , IL-1 β (Selsted et al. 1985, J. Harder et al. 1997 b, Schibli et al. 2002, Shai 2002, Zasloff 2002, Liu et al. 2002, J. Harder et al. 2004) und Interferon- γ (Duits et al. 2001, J. Harder et al. 2004). Dieser Induktionsmechanismus soll über die Toll-like receptors -2 und -4 geregelt sein (Hoshino et al. 1999, Schwandner et al. 1999, Kikuchi et al. 2002, Midorikawa et al. 2003, Wang et al. 2003) und könnte Ansatz für neue Therapien zur Infektionsprophylaxe durch körpereigene antimikrobielle Peptide in der Knochenchirurgie, Implantologie oder Parodontologie werden.

Neben der Beschreibung auf epithelialen Oberflächen, Neutrophilen und Paneth-Zellen (Cowland et al. 1995, Ouellette und Selsted 1996, Ganz 1999), gibt es in der Literatur keinen Hinweis, ob humane mesenchymale Zellen wie Osteozyten antimikrobielle Peptide zur Infektabwehr exprimieren können. Bisher galt die Expression humaner antimikrobieller Peptide beziehungsweise humaner Beta-Defensine als Domäne epithelialer Zellen (Zhao et al. 1996).

Ziel der vorliegenden Studie ist es, zu prüfen, ob die drei antimikrobiellen Peptide - die humanen Beta-Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 - in humanem Knochen gefunden werden können. Für diese Studie soll ein immunhistochemischer Nachweis verwendet werden, um die drei humanen Beta-Defensine in histologischen Schnitten von infiziertem und nicht infiziertem Kieferknochen sowie Schnitten von Scapula, Crista iliaca und Fibula zu detektieren. Sofern Defensine auch in skelettalem Knochen außerhalb der Schleimhaut gebildet werden können, könnten herbeigeführte Induktionsmechanismen auch in diesen Lokalisationen die lokale Infekteresistenz des Knochens erhöhen. Die Entschlüsselung solcher Induktionsmechanismen würde neue Therapieansätze für die Infektionsprophylaxe in der Knochenchirurgie offenbaren.

2. Material und Methoden

Es soll geprüft werden, ob in Kieferknochen und anderen skelettalen Lokalisationen die humanen Beta-Defensine -1, -2 und -3 immunhistochemisch nachgewiesen werden können.

2.1. Material

Jeweils fünf Proben von nicht infiziertem Kieferknochen, von nicht infiziertem Beckenkammknochen, von nicht infiziertem Scapulaknochen sowie von nicht infiziertem Fibulaknochen wurden im Rahmen plastisch-rekonstruktiver Eingriffe bei Tumorpatienten gewonnen. Des Weiteren wurden zum Vergleich, bei therapeutisch intendierten Eingriffen fünf Proben von infizierten Kieferknochen gewonnen. Dabei wurden bei Patienten nur Proben aus vitalem Knochen im Kontaktbereich zur Osteonekrose gewonnen (Abbildung 4).

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt. (AZ: D 309/00)

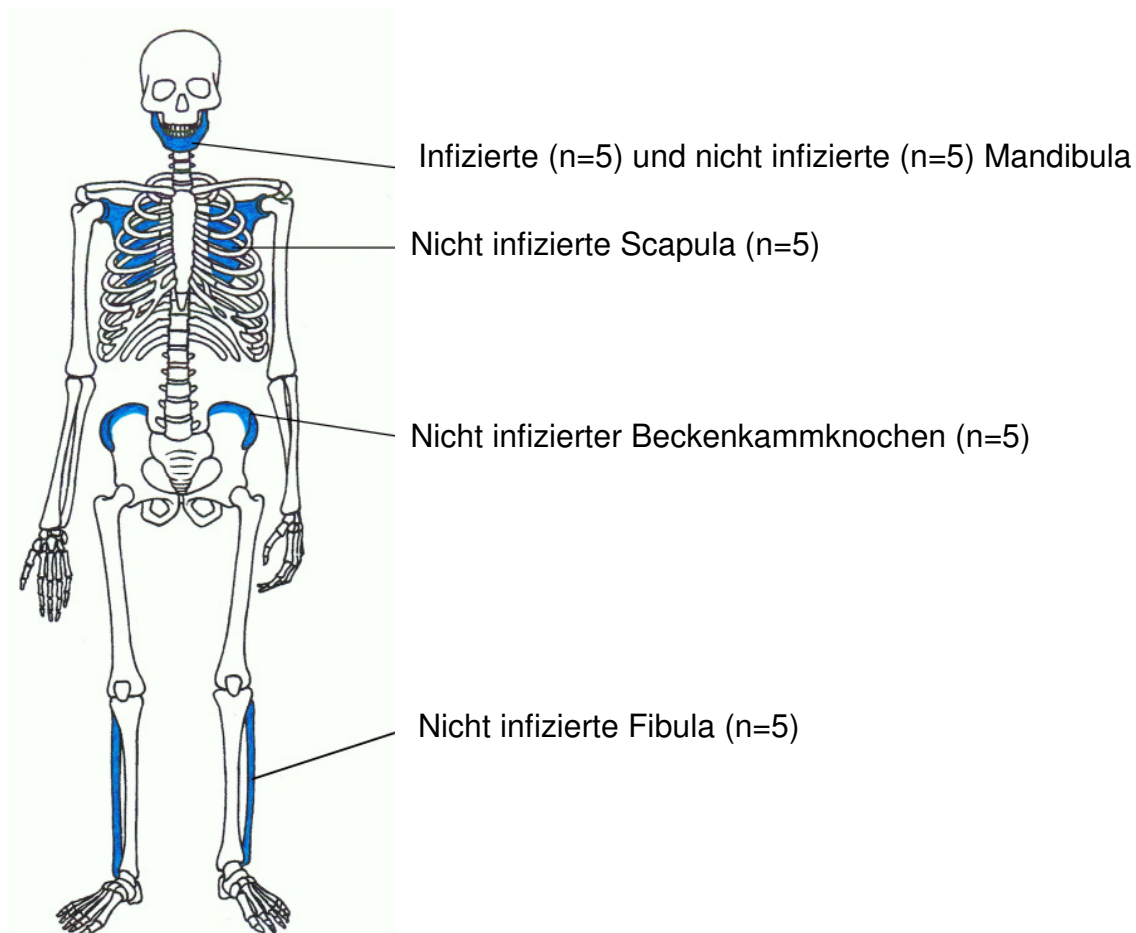


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entnahmeorte der verwendeten Proben

2.2. Methoden

Nach der Formalinfixierung wurden die Knochenbiopsien entkalkt und in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 bis 10 Mikrometer dicke Schliffe mit dem Mikrotom (Reichert-Jung, Leica-Microsystems AG, Wetzlar, D) angefertigt, die dann immunhistochemisch untersucht wurden.

Die immunhistochemische Untersuchung auf die antimikrobiellen Peptide hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurde mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Complex (Strept ABC)-Technik durchgeführt. Die Defensine wurden jeweils auf verschiedenen Schliffen einzeln geprüft.

2.2.1. Schnittvorbereitung zur Färbung

Als Vorbereitung für die Färbung der Paraffinschnitte musste eine ausreichende Menge Pufferlösung hergestellt werden.

Für den Puffer wurden folgende Materialien und Substanzen verwendet:

- 15,76g Tris HCl für 2l Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- 17,4 g NaCl für 2l Puffer (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Aqua dest. 2l
- HCl/NaOH nach Bedarf für die pH-Wert Einstellung (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Magnetrührgerät (IKA-Combimag RCT, IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen, D)
- Digital pH-Meter (Erich Eydam KG, Kronshagen, D)
- elektrische Waage (Sartorius 1212 MP, Sartorius AG, Göttingen, D)

Nach dem Vermengen der Substanzen wurden die Pufferlösungen zunächst auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt.

Anschließend wurde die Antikörper-Lösung hergestellt. Das dazu benötigte 1%ige Rinderalbumin (Albumin Bovine, Fraction V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) wurde mit dem Puffer zu circa 50ml Volumen vermischt.

Um die eigentliche Färbung der Schlitze durchzuführen, mussten die Paraffinschnitte von dem Paraffin befreit werden.

Folgende Substanzen und Materialien wurden dazu benötigt:

- Xylol ($C_6H_4(CH_3)_2$, J.T. Baker, Griesheim, D)
- Ethanol (J.T. Baker, Griesheim, D)
- Aqua dest.
- 3%iges H_2O_2 (30% Perhydrol pro analysi (verdünnt), Merck KGaA, Darmstadt, D)
- 14 Küvetten (Roth H 554.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D)
3 für die Xylolbäder, 7 für die Alkoholreihe, 1 für das H_2O_2 -Bad, 1 für das Aqua dest.-Bad, 2 für das Pufferbad
- 14 Küvettendeckel (Roth H 554.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D)

Durch drei 10minütige Xylolbäder erfolgte die Paraffinentfernung. Eine sich daran anschließende absteigende Alkoholreihe mit den Konzentrationen 100%, 96%, 90%,

80%, 70%, 60% und 50% für jeweils fünf Minuten führte zur Rehydrierung der Proben.

Danach wurden die Schnitte für fünf Minuten in ein 3%iges H_2O_2 -Bad getaucht, um eine Antikörper-Reaktion mit endogenen Peroxidasen zu vermeiden. Abschließend erfolgte eine Spülung in einem Aqua dest.-Bad sowie ein Bad in der Pufferlösung für jeweils fünf Minuten.

2.2.2. Schnittfärbung

Im Anschluss an die Paraffinentfernung und Rehydrierung der Proben, wurde die Färbung der Defensine, die die Antigene darstellen, wie folgt durchgeführt. Die positiven Kontrollen wurden auf die gleiche Weise wie die von uns zu untersuchenden Präparate immunhistochemisch gefärbt.

Die Proben auf den Schliffen wurden zuerst mithilfe des Dako Pen umrandet, um die verwendeten Substanzen auf den begrenzten Bereich zu verteilen und so eine sichere Färbung zu gewährleisten.

Benötigte Substanzen und Materialien dafür waren:

- Anti-Human Kaninchen-Antikörper gegen hBD-1, -2 und -3 (Biologo Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Kronshagen, D)
mit : Anti-Beta-Defensin-1 (Artikelnr.: DEF01-S)
Anti-human-Beta-Defensin-2 (Artikelnr.: DEF002)
Beta-Defensin-3 (Artikelnr.: DEF03-A)
- Strept AB Complex/ HRP Duet Mouse/Rabbit Box (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D)
mit drei Substanzen: A= Streptavidin,
B= Biotinylated Peroxidase,
C= Biotinylated Goat Anti-Mouse/Rabbit 1%
- 50ml 1%iges Rinderalbumin/Puffer-Gemisch (Albumin Bovine, Fraction V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- Aqua dest.
- Leitungswasser
- AEC Substrat (AEC Substrate Chromogen, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D)
- Mayers Hämalunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, D)

- Kaisers Glycerin Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Objektträgerplättchen (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, D)
- Dako-Pen (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D)
- Mikroliterpipetten (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, D)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D)
- Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, D)

Auf die Schliffe wurde der jeweilige Anti-Human Kaninchen-Antikörper Anti-hBD -1, -2 oder -3 im Überschuss aufgetragen, um eine sichere Reaktion zwischen dem Defensin und dem Antikörper zu gewährleisten. Der verwendete Antikörper ist ein Immunglobulin G (IgG) vom Kaninchen und wurde verdünnt verwendet. Zur Verdünnung diente 1%iges Rinderalbumin im Verhältnis 1:500.

Nach einer Einwirkzeit von zwei Stunden wurde die überschüssige Antikörper-Lösung in drei Pufferbädern für je fünf Minuten abgespült.

Bei den Kontrollpräparaten (=Neg.) wurde in den folgenden Schritten ebenso verfahren, wie mit den von uns zu untersuchenden Schliffen. Es erfolgte jedoch kein vorheriges Auftragen der Anti-Human Kaninchen-Antikörper Anti-hBD-1, -2 und -3 auf die Kontrollpräparate. Dies geschah, um einen Vergleich mit den zu untersuchenden Präparaten für den Nachweis der Defensine zu erzielen.

Auf den jetzt entstandenen Antigen/Antikörper-Komplex erfolgte ein erneutes Auftragen mit einem zweiten Antikörper (Reagenz C der HRP Duet Mouse/Rabbit Box). Dieser zweite Antikörper (Biotinylated Goat Anti-Mouse/Rabbit) wurde ebenfalls mit der am Anfang hergestellten Pufferlösung verdünnt. Dafür wurden 5ml Puffer mit 50µl Kaninchen-Antiserum vermischt. Dieser Antikörper wurde ebenfalls im Überschuss auf alle zu untersuchenden Schliffe aufgetragen, um eine sichere Reaktion zwischen dem Biotinylated Goat Anti-Mouse/Rabbit und dem Antigen/Antikörper-Komplex hervorzurufen.

Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten. Anschließend erfolgte wiederum eine Waschung in drei Pufferbädern für jeweils fünf Minuten.

Danach schloss sich die eigentliche Färbung des Antigen/Antikörper-Komplexes an. Diese Färbung wurde mit dem Strept AB (Streptavidin)-Komplex erzielt. Zum Auftragen auf die Schliffe wurden erneut 5ml Puffer mit 50µl Streptavidin (Reagenz A der HRP Duet Mouse/Rabbit Box) vermischt. Zusätzlich wurden noch 50µl Biotinylated Peroxidase (Reagenz B der HRP Duet Mouse/Rabbit Box) hinzu gegeben. Dieser Komplex wurde wieder im Überschuss aufgetragen.

Die Einwirkzeit betrug etwa 30 Minuten und wurde dann in einem Puffer-Bad circa fünf Minuten lang abgespült.

Der Strept AB (Streptavidin)-Komplex enthält das Enzym HRP (=Horse Reddish Peroxidase), welches das AEC Substrat umsetzt, so dass sich eine Färbung abzeichnet.

Anschließend wurden vier Tropfen des zuvor schon erwähnten AEC Substrates auf die Schliffe aufgetragen, welches eine 5 bis 15minütigen Einwirkzeit hatte. In den Schliffen erfolgte nach der Zugabe eine Umsetzung durch das Enzym Horse Reddish Peroxidase, wodurch ein braunroter Farbkomplex entstand. Die anschließende Abspülung erfolgte mit Aqua dest. Ein aufgetretener Farbumschlag deutete makroskopisch auf einen positiven Defensinbefund hin.

Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit der Hämalaunlösung als Kernfärbung. Dafür wurde die Hämalaunlösung im Überschuss für 5 bis 10 Minuten aufgetragen und mit Leitungswasser wieder abgespült. Die Salze des Leitungswassers wurden wiederum kurz mit Aqua dest. abgewaschen. Diese Gegenfärbung färbte nun das gesamte Gewebe blau an, bis auf die zuvor schon gefärbten Defensine und unterstützte so eine gute mikroskopische Arbeit.

Zum Schluss erfolgte die Eindeckung der fertig gefärbten Schliffe unter Zuhilfenahme der Kaisers Glycerin Gelatine, welche zuvor im Brutschrank bei 36°C verflüssigt wurde. Nach der Aushärtung der Gelatine konnten die Schliffe mikroskopisch auf das Vorhandensein von Defensinen untersucht werden.

2.3. Auswertungsverfahren

2.3.1. Semiquantitative Analyse

Die Intensität und Verteilung der Immunreaktion wurde subjektiv beurteilt und ein Punktwertmaßstab erstellt (Tabelle 1; Abbildung 20). Je mehr Immunreaktionen vorhanden waren, desto mehr antimikrobielle Peptide waren vorhanden. Daraus folgte, dass bei intensiver Immunreaktion und generalisierter Verteilung eine hohe Abwehrfunktion durch die antimikrobiellen Peptide vorhanden war.

Der Bewertungsmaßstab setzte sich durch eine Punktvergabe für die Immunreaktionen wie folgt zusammen:

1 Punkt: Immunreaktion in Osteozyten

1 Punkt: Immunreaktion entlang Endostzellen und Gefäßkanälen.

1 Punkt: Feine Immunbanden in mineralisierter Matrix bis ca. 1-2 Osteozytenbreiten

1 Punkt: Extrapunkt für kräftige, barriereartige Immunbanden in mineralisierter Matrix größer als 2 Osteozytenbreiten.

Die Ergebnisse sind auf den Folgeseiten dargestellt.

2.3.2. Verwendete Analysegeräte

Für die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde das Nikon Microphot-FXA Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, D), mit angebrachter Kamera verwendet. Bei der verwendeten Digitalkamera handelte es sich um eine AxioCam (Nikon, Düsseldorf, D). Eine Bearbeitung und Beschriftung der Fotos wurde mithilfe des Adobe Photoshop CS Programms (Adobe Systems GmbH, München, D) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollen

Als Kontrollen wurden Schnitte von einem Mundschleimhautpräparat gewonnen. Für Mundhöhlenepithel ist der positive Nachweis von den drei humanen Beta Defensinen -1, -2 und -3 belegt (Bensch et al. 1995, Dunsche et al. 2002). Die Abbildung 5 zeigt den immunhistochemischen Nachweis aller drei Defensine in den Kontrollpräparaten aus Mundschleimhautepithel.

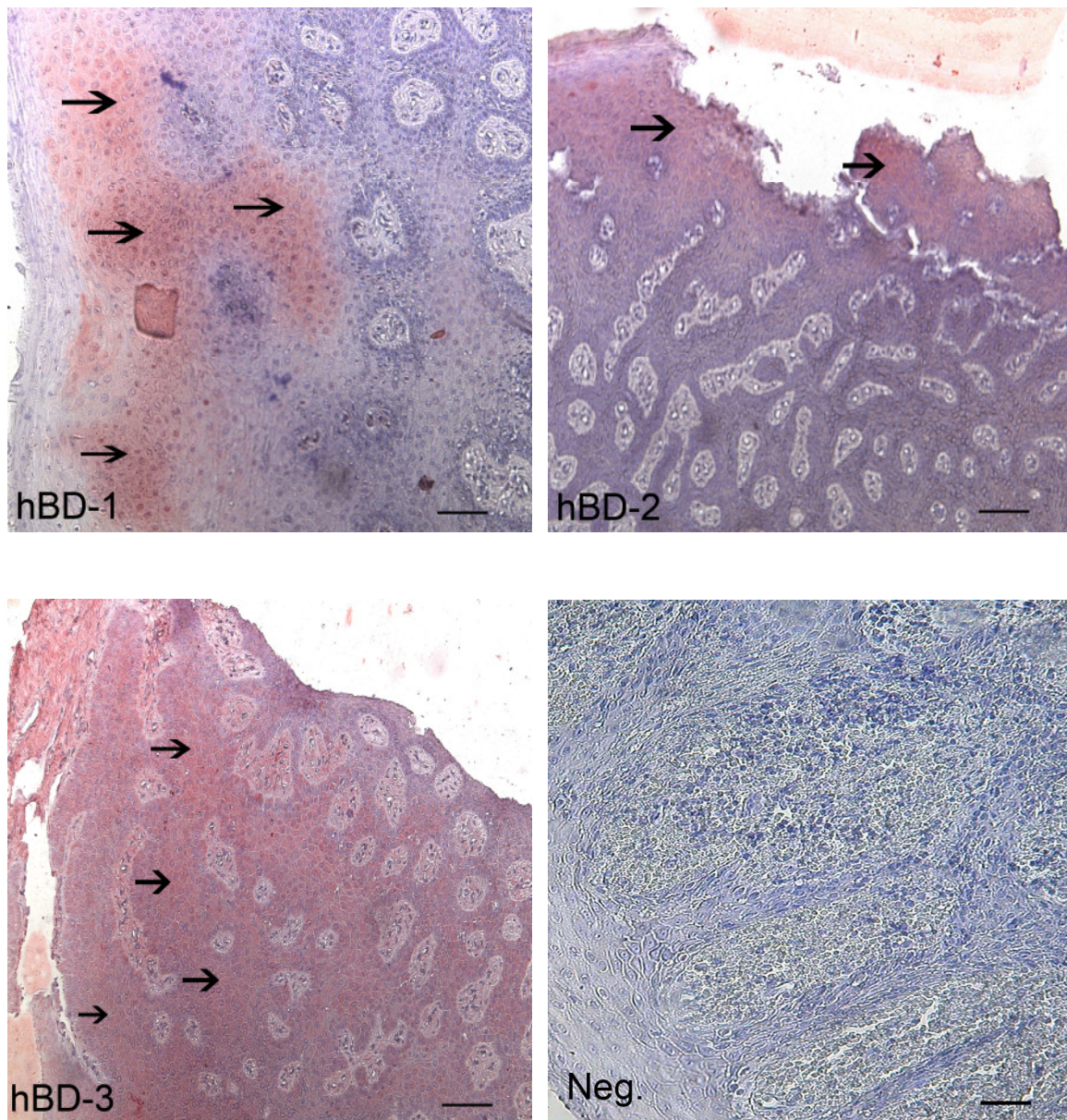


Abbildung 5: Nachweis der humanen Beta Defensine -1, -2, und -3 sowie ein Kontrollpräparat (=Neg.) aus der Mundschleimhaut

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind
—: entspricht ~ 100 µm)

3.2. Immunhistochemische Auswertung

3.2.1. Infizierter humaner Unterkieferknochen

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Knochenschliffe von infiziertem Kieferknochen erbrachten deutliche Immunreaktionen für alle drei Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in allen Proben (Abbildung 6, Abbildung 7). Die Defensine wurden an zwei Lokalisationen gefunden.

Zum Einen traten ausgeprägte Immunreaktionen in dichten Banden an der Grenzzone zwischen infiziertem Knochenmark und Knochenmatrix auf. Dabei war die maximale Ausprägung unterhalb der Zellschichten des Endosts, aber innerhalb der Knochenmatrix, zu finden (Abbildung 6, Abbildung 7).

Die linksseitigen Bilder in den Abbildungen stellen die humanen Beta Defensine mit einer 20-fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm). Die rechtsseitigen Bilder dagegen stellen Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm).

Zum Anderen konnte eine Immunreaktivität für alle drei Defensine auch innerhalb des Cytoplasmas der Osteozyten selbst nachgewiesen werden (Abbildung 8).

Gemäß der semiquantitativen Analyse weist der infizierte Unterkieferknochen die höchsten Immunreaktionen auf. Er erreicht einen Maximalpunktwert von 12, sowie bei allen untersuchten Präparaten einen Mittelwert von 11,4 (Tabelle 1, Abbildung 20) Die einzelnen Punktwerte der jeweiligen Defensine sind in Tabelle 2 und Abbildung 21 dargestellt.

Die Kontrolle zeigte keine Immunfärbungen gegen alle drei Defensine (Abbildung 7, Abbildung 8).

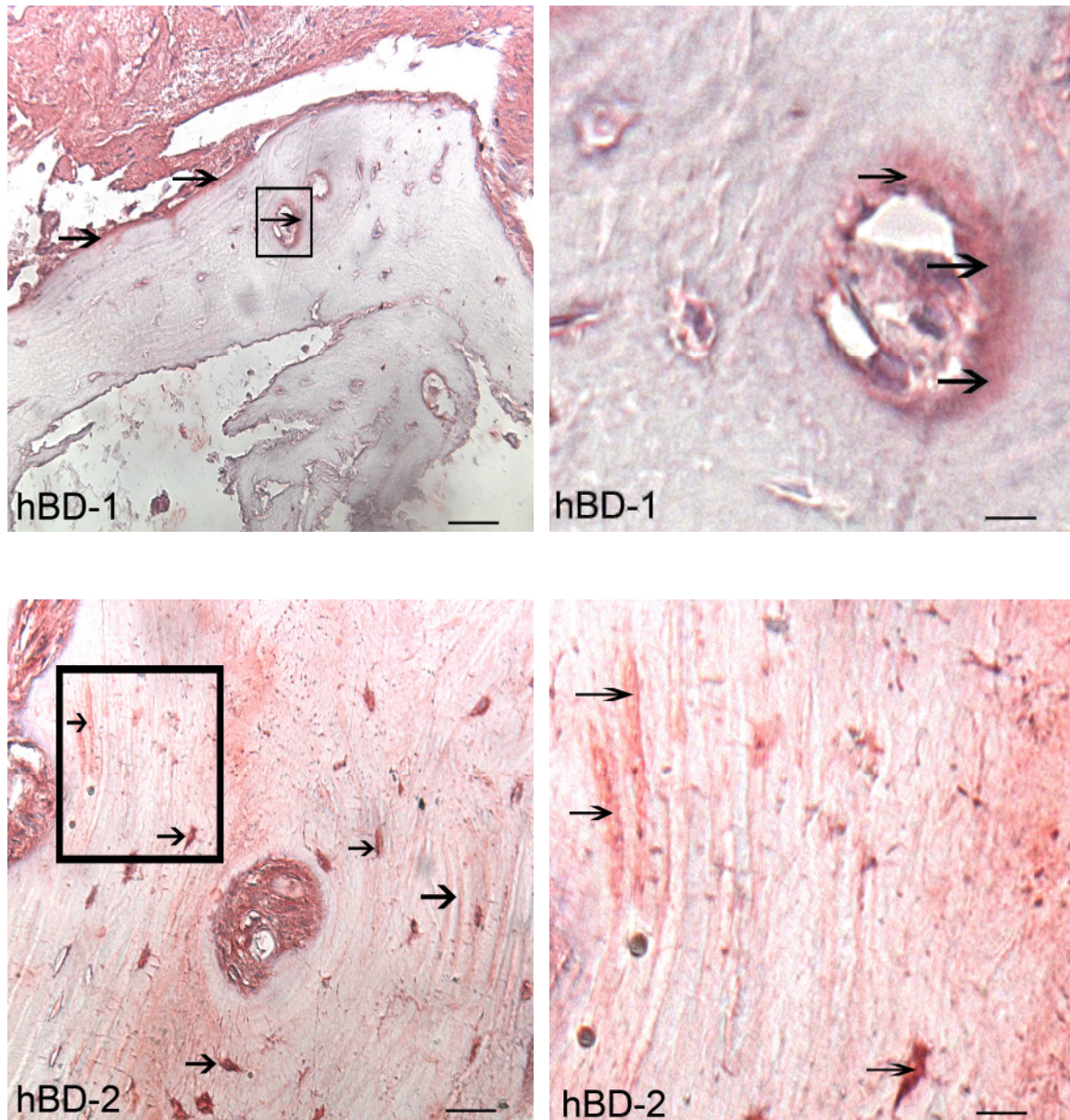


Abbildung 6: Nachweis von humanen Beta Defensinen -1 und -2 im infizierten Unterkieferknochen

Immunreaktionen (→) zeigen sich entlang des Endosts und innerhalb der Knochenmatrix.

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

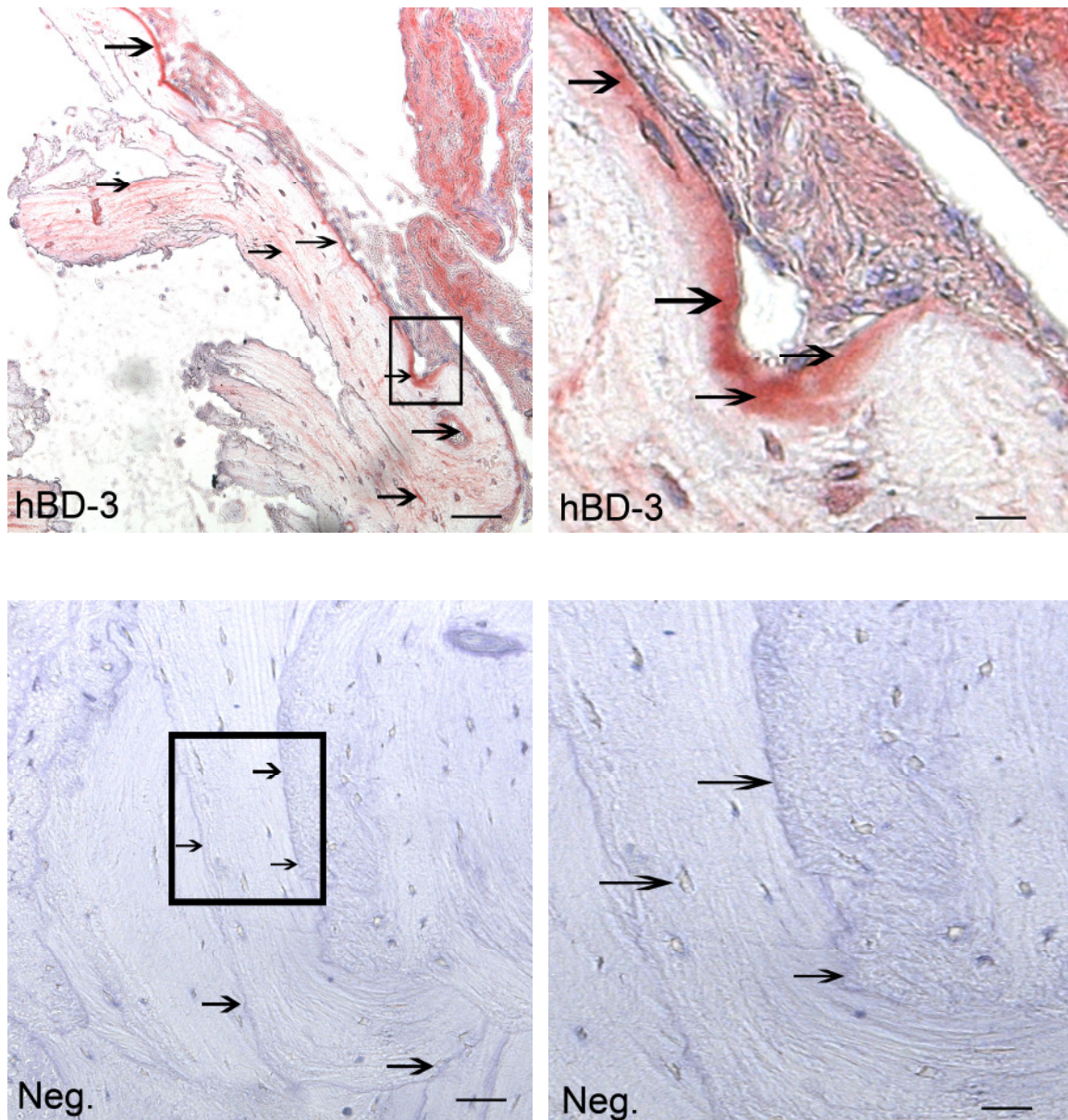


Abbildung 7: Nachweis von humanem Beta Defensin 3 im infizierten Unterkieferknochen sowie ein Kontrollpräparat (=Neg.)

Immunreaktionen (→) zeigen sich ebenfalls entlang des Endosts und innerhalb der Knochenmatrix.

Es traten bei dem Kontrollpräparat keine Immunreaktionen (→) auf.

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind, beziehungsweise erkennbar wären

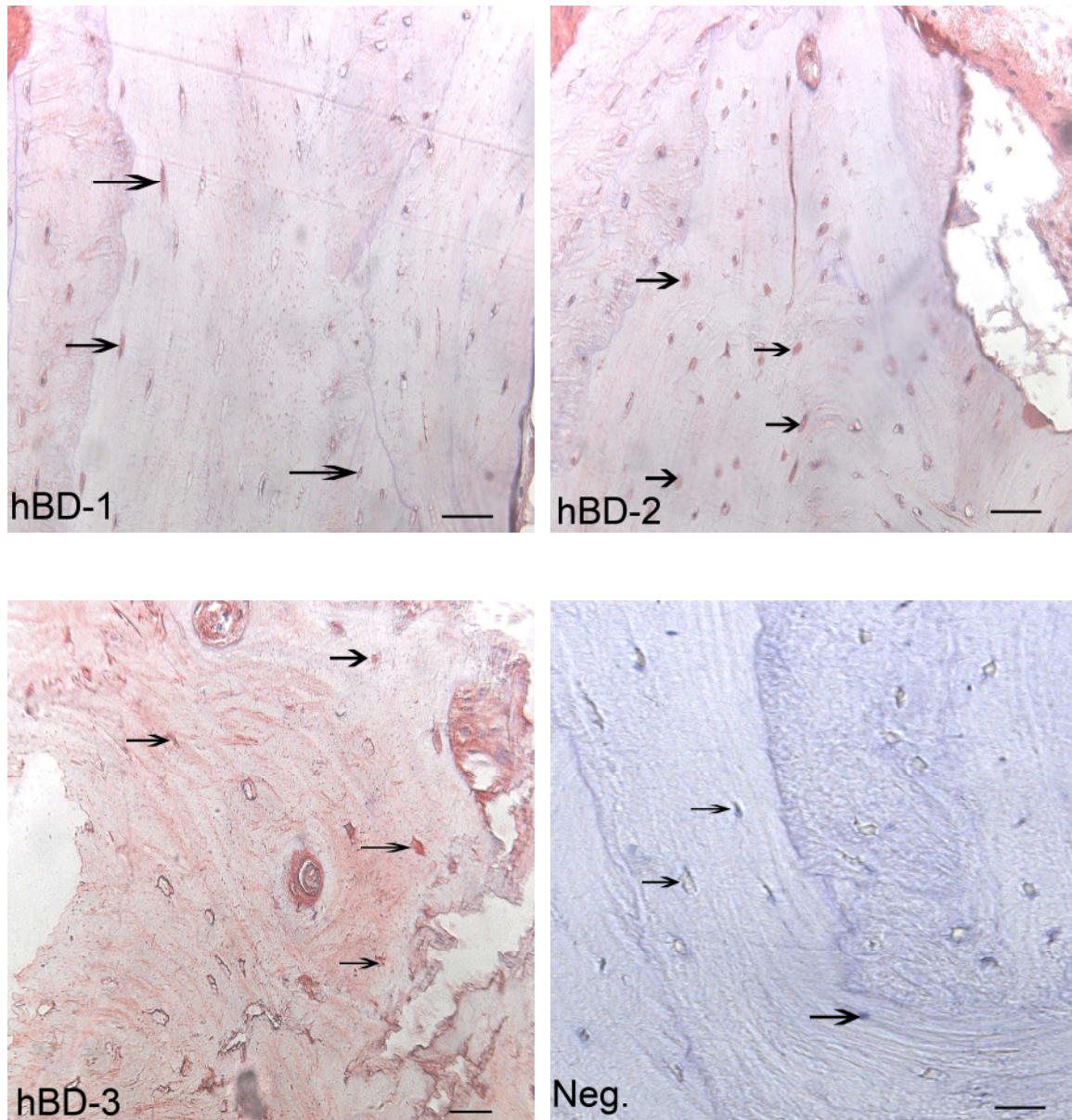


Abbildung 8: Nachweis von Defensinen in den Osteozyten des infizierten Unterkiefers und ein Kontrollpräparat (Neg.)

Nachweis (→) der humanen Beta Defensine -1, -2 und -3 im infizierten Unterkieferknochen im Cytoplasma der Osteozyten, sowie ein Kontrollpräparat.

Alle Bilder stellen Vergrößerungen der Osteozyten dar (—: entspricht ~ 25µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine innerhalb der Osteozyten erkennbar sind, beziehungsweise erkennbar wären

3.2.2. Nicht infizierter humaner Unterkieferknochen

Die immunhistochemischen Untersuchungen von nicht infiziertem Kieferknochen zeigten deutlich geringer ausgeprägte Immunfärbungen für die drei Defensine hBD-1 hBD-2 und hBD-3 in allen Proben im Vergleich zu den infizierten Präparaten (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11). Das Defensin hBD-3 konnte unterhalb

endostaler Zelllinien innerhalb der Knochenmatrix und entlang von Gefäßkanälen am deutlichsten detektiert werden (Abbildung 10). Immunreaktionen gegen die Defensine hBD-1 und hBD-2 waren ebenfalls vorhanden, aber in geringerer Ausprägung (Abbildung 9, Abbildung 10).

Eine Detektion im Cytoplasma der Osteozyten konnte nur bei humanen Beta Defensin 3 nachgewiesen werden (Abbildung 12). Die Defensine hBD-1 und -2 konnten nicht oder nur sehr undeutlich im Cytoplasma der Osteozyten nachgewiesen werden.

Gemäß der semiquantitativen Analyse zeigte nicht infizierter Unterkieferknochen die zweithöchsten Immunreaktionen mit einem Maximalpunktwert von 7 sowie bei allen untersuchten Präparaten einen Mittelwert von 6,8 (Tabelle 1, Abbildung 20). Die einzelnen Punktwerte der Defensine sind in Tabelle 2 und Abbildung 21 dargestellt. Die Kontrolle zeigte keine Immunfärbungen gegen alle drei Defensine (Abbildung 11).

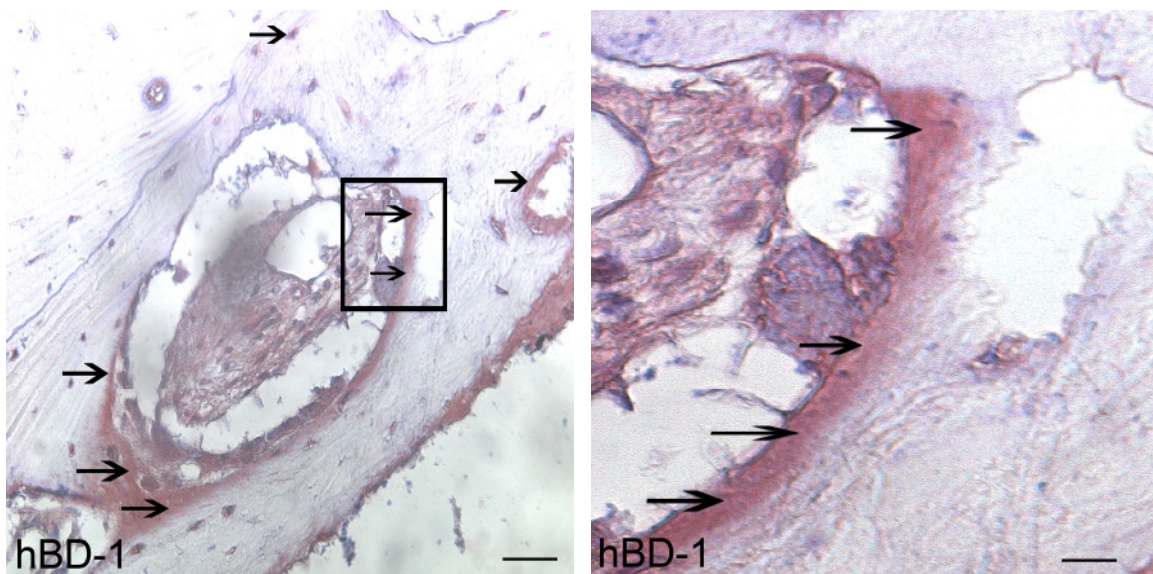


Abbildung 9: Nachweis von humanem Beta Defensin 1 im nicht infizierten Unterkieferknochen

Immunreaktionen (→) sind entlang des Endosts und innerhalb der Knochenmatrix zu finden.

Die linksseitigen Bilder stellen die Defensine mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

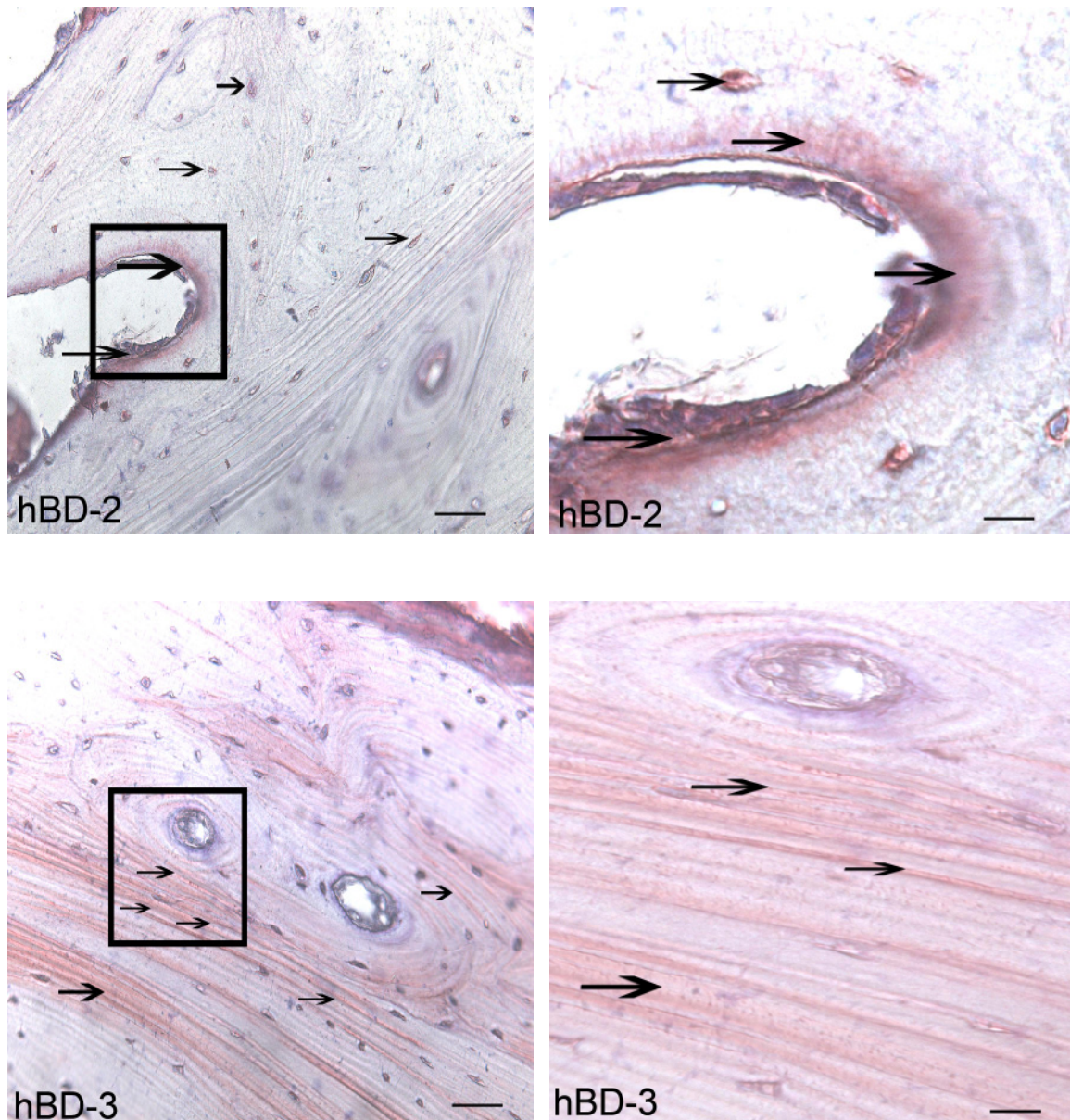


Abbildung 10: Nachweis von humanen Beta Defensinen -2 und -3 im nicht infizierten Unterkieferknochen

Immunreaktionen (→) sind entlang des Endosts und innerhalb der Knochenmatrix zu finden.

Die linksseitigen Bilder stellen die Defensine mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

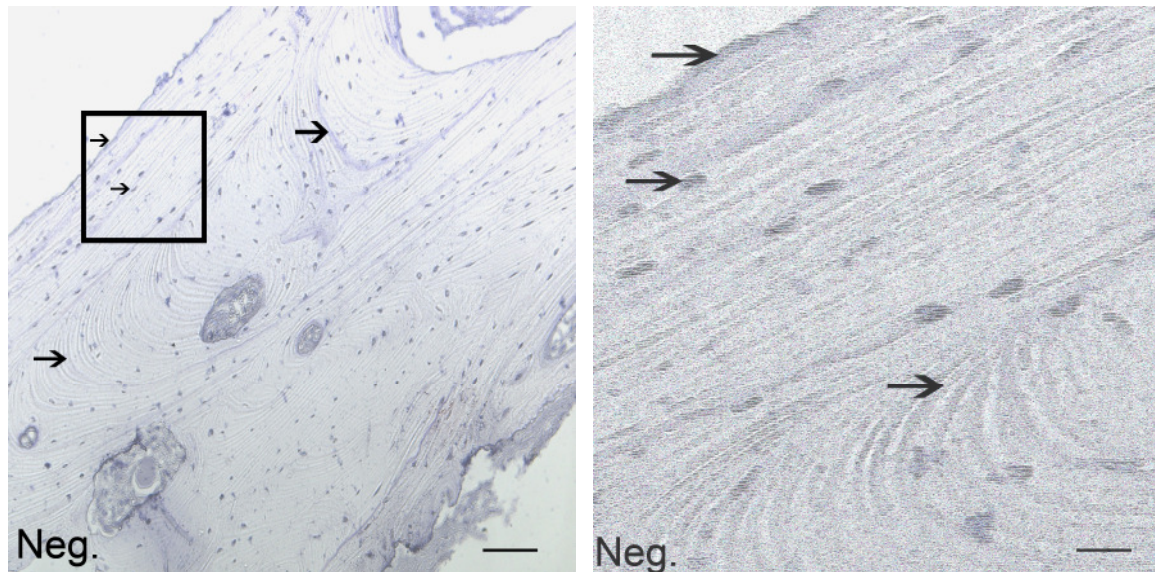


Abbildung 11: kein Nachweis der humanen Beta Defensine -1, -2 und -3 in einem Kontrollpräparat (=Neg.) des nicht infizierten Unterkiefers

Es finden sich keinerlei Immunreaktionen (→).

Die linksseitigen Bilder stellen das Untersuchungsgebiet mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar wären

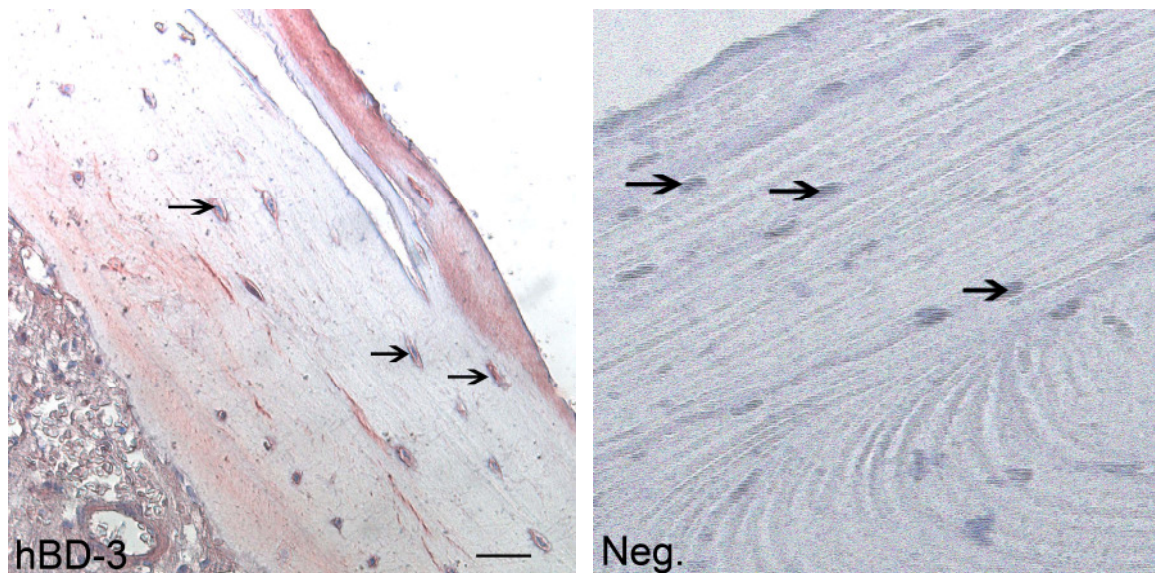


Abbildung 12: Nachweis des humanen Beta Defensins 3 in den Osteozyten im nicht infizierten Unterkieferknochen und ein Kontrollpräparat (=Neg.)

Nachweis (→) des am deutlichsten erkennbaren humanen Beta Defensin 3 im nicht infizierten Unterkieferknochen im Cytoplasma der Osteozyten sowie im Kontrollpräparat.

Die Bilder stellen Vergrößerungen der Osteozyten dar (—: entspricht ~ 25µm)

Die humanen Defensine -1 und -2 sind nicht oder nur sehr undeutlich zu erkennen.

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine innerhalb der Osteozyten erkennbar sind oder wären (bei Neg.)

3.2.3. Nicht infizierter humaner Beckenknochen (Crista iliaca)

Die immunhistochemische Untersuchung bestätigte die Expression von hBD-3 entlang der endostalen Zellreihen und in feinen Banden innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix in allen Proben (Abbildung 14). Immunreaktionen gegen hBD-1 waren ebenfalls vorhanden, aber in etwas geringerer Ausprägung und ausschließlich entlang den endostalen Zellreihen (Abbildung 13). Vereinzelt und daher am geringsten traten die Immunfärbungen bei dem Defensin hBD-2 auf (Abbildung 13). Immunreaktionen gegen alle drei Defensine hBD-1, -2 und -3 konnten nicht im Cytoplasma der Osteozyten nachgewiesen werden. Die linksseitigen Bilder der Abbildungen stellen die Defensine wieder mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht $\sim 100 \mu\text{m}$), während die rechtsseitigen Bilder die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder darstellen (—: entspricht $\sim 25 \mu\text{m}$).

Die semiquantitative Analyse vom Beckenknochen ergab einen Maximalpunktwert von 6 sowie bei allen untersuchten Präparaten einen Mittelwert von 5,8 (Tabelle 1, Abbildung 20). Die einzelnen Punktwerte der Defensine sind in Tabelle 2 und Abbildung 21 dargestellt.

Die Kontrolle zeigte keine Immunfärbungen gegen alle drei Defensine (Abbildung 14).

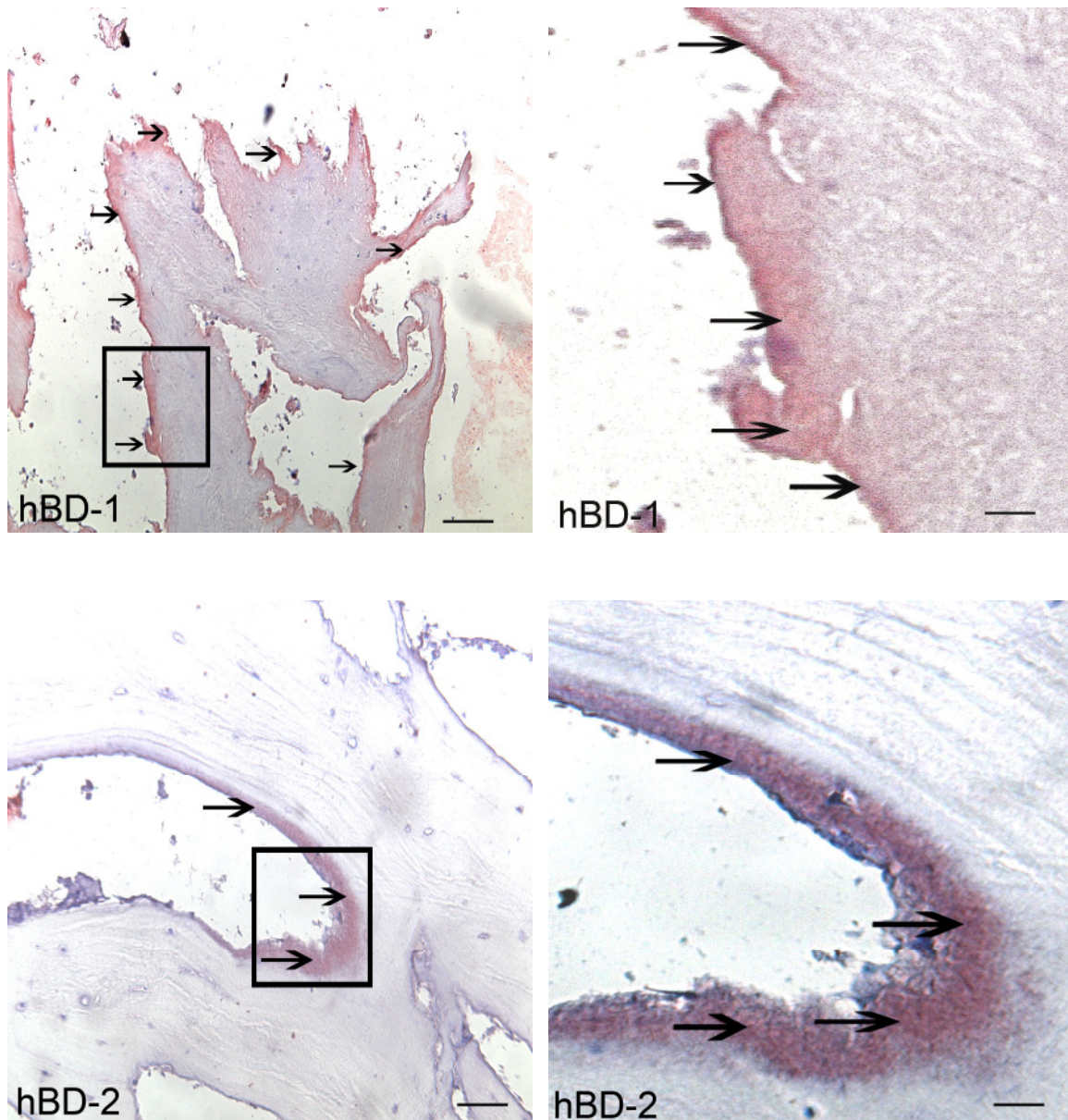


Abbildung 13: Nachweis von humanen Beta Defensinen -1 und -2 in einem nicht infizierten Crista iliaca Präparat

Die Immunreaktionen (→) treten weniger deutlich entlang des Endosts auf und nur vereinzelt innerhalb der Knochenmatrix.

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

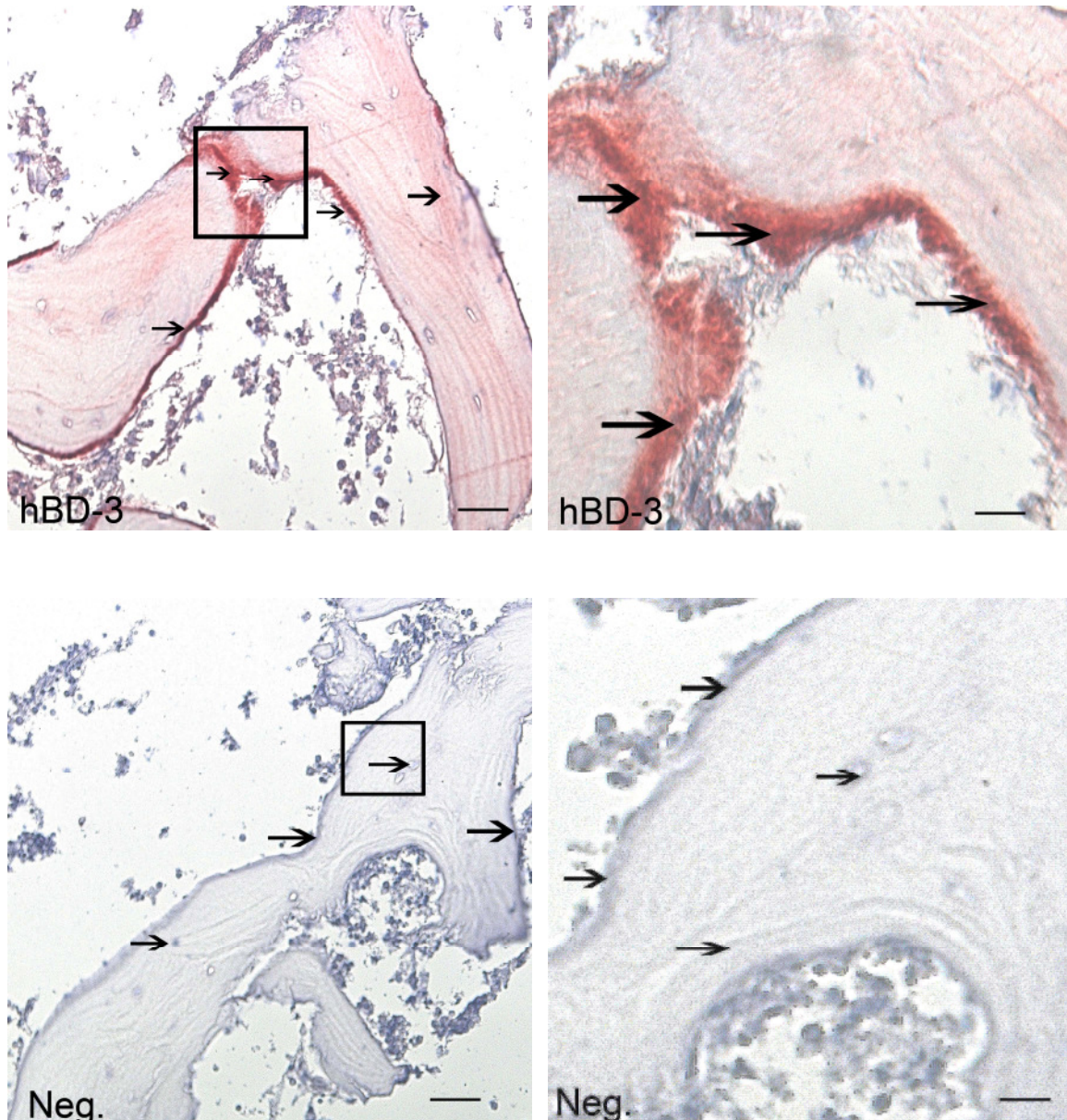


Abbildung 14: Nachweis von humanem Beta Defensin 3 in einem nicht infizierten Crista iliaca Präparat sowie fehlender Nachweis aller drei Defensine im Kontrollpräparat (=Neg.)

Immunreaktionen (→) finden sich sowohl entlang des Endosts, als auch innerhalb der Knochenmatrix bei hBD-3.

Bei den Kontrollpräparaten treten erneut keine Immunreaktionen auf.

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind, beziehungsweise erkennbar wären

3.2.4. Nicht infizierter humaner Scapulaknochen

Die immunhistochemischen Untersuchungen von Scapulaknochen zeigten ebenfalls geringere Immunreaktionen gegen hBD-3 entlang der Gefäßkanäle und des Endosts, verglichen mit infiziertem Mandibulaknochen (Abbildung 16). HBD-1 und -2 konnten nur schwer detektiert werden, da sie nur unscharf und vereinzelt auftraten (Abbildung

15, Abbildung 16). Innerhalb der Osteozyten wurden auch hier keine Immunreaktionen gegen die drei Defensine hBD-1, -2 und -3 nachgewiesen.

Die semiquantitative Analyse vom Scapulaknochen ergab einen Maximalpunktwert von 4, sowie bei allen untersuchten Präparaten einen Mittelwert von 3,8 (Tabelle 1, Abbildung 20). Die einzelnen Punktwerte der Defensine sind in Tabelle 2 und Abbildung 21 dargestellt.

Die Kontrolle zeigte keine Immunfärbungen gegen alle drei Defensine (Abbildung 17).

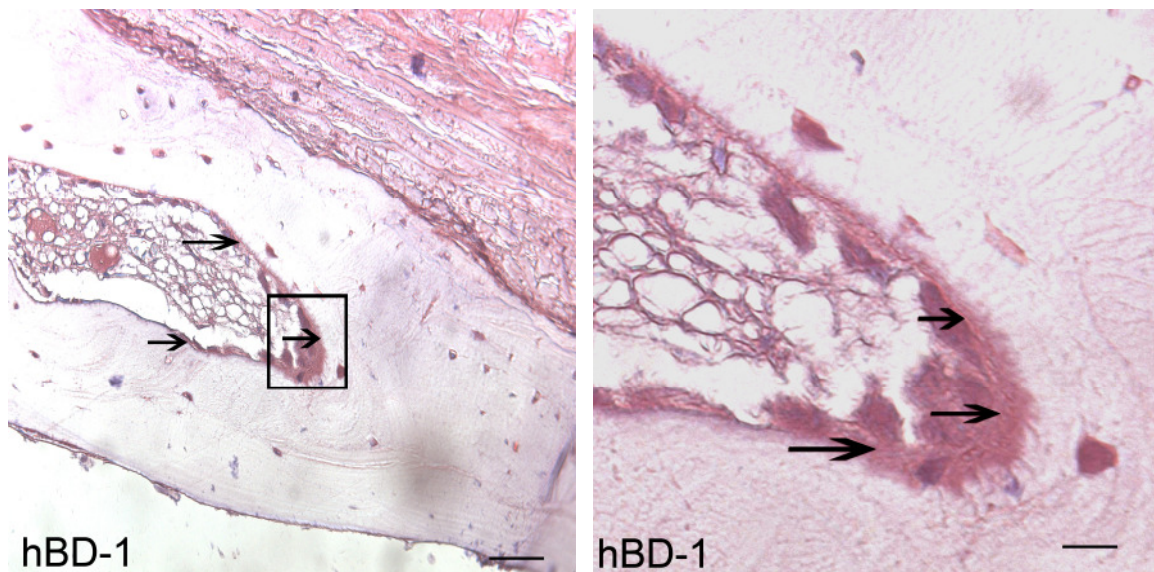


Abbildung 15: Nachweis von humanem Beta Defensin 1 in einem nicht infizierten Scapulapräparat

Immunreaktionen (→) von hBD-1 zeigen sich nur undeutlich entlang des Endosts.

Die linksseitigen Bilder stellen die Defensine mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

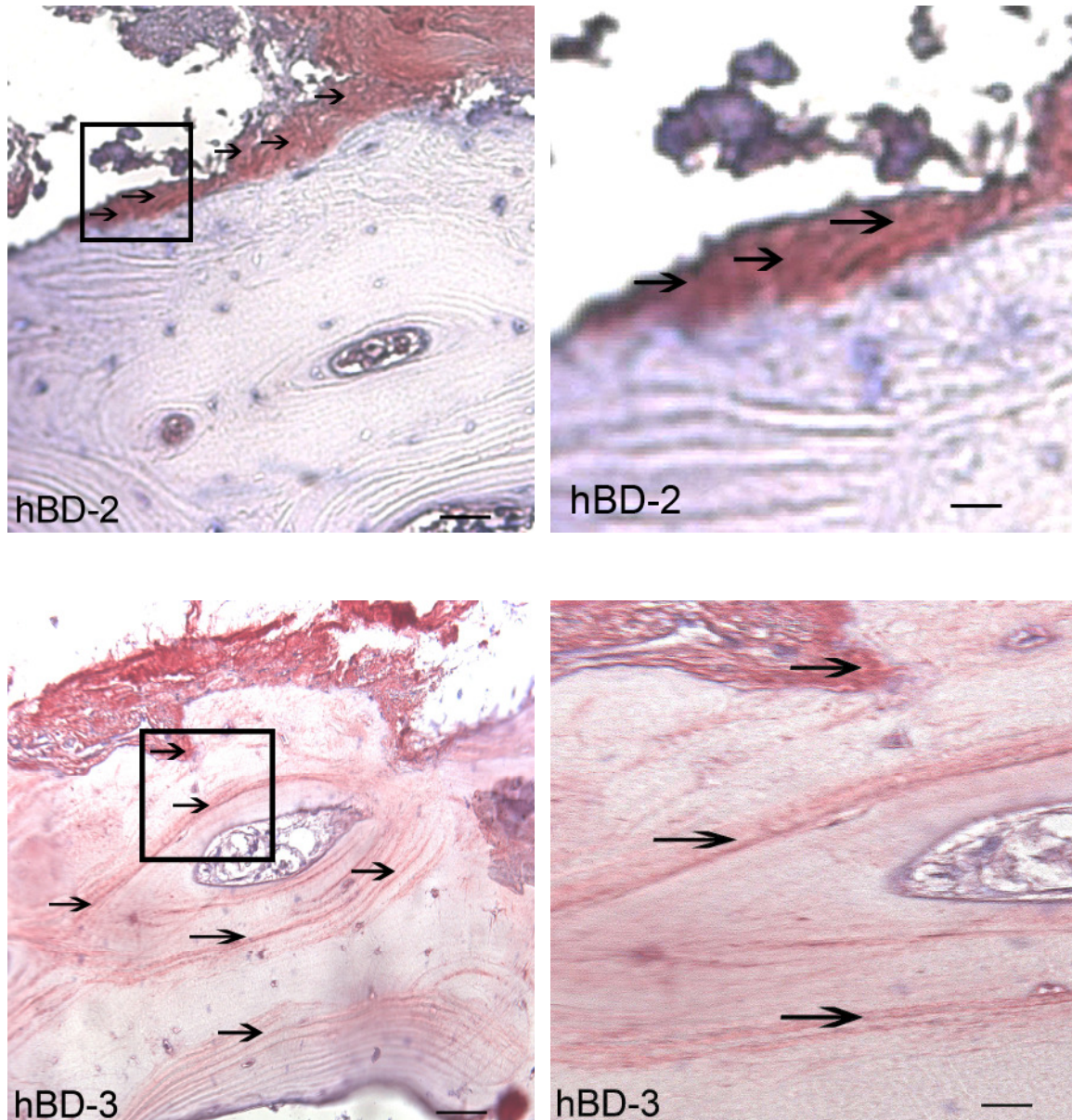


Abbildung 16: Nachweis von humanen Beta Defensinen -2 und -3 in einem nicht infizierten Scapulapräparat

Immunreaktionen (→) von hBD-2 zeigen sich nur undeutlich entlang des Endosts und innerhalb der Knochenmatrix.

Bei hBD-3 finden sich die Immunreaktionen (→) deutlich entlang des Endosts und innerhalb der Knochenmatrix

Die linksseitigen Bilder stellen die Defensine mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

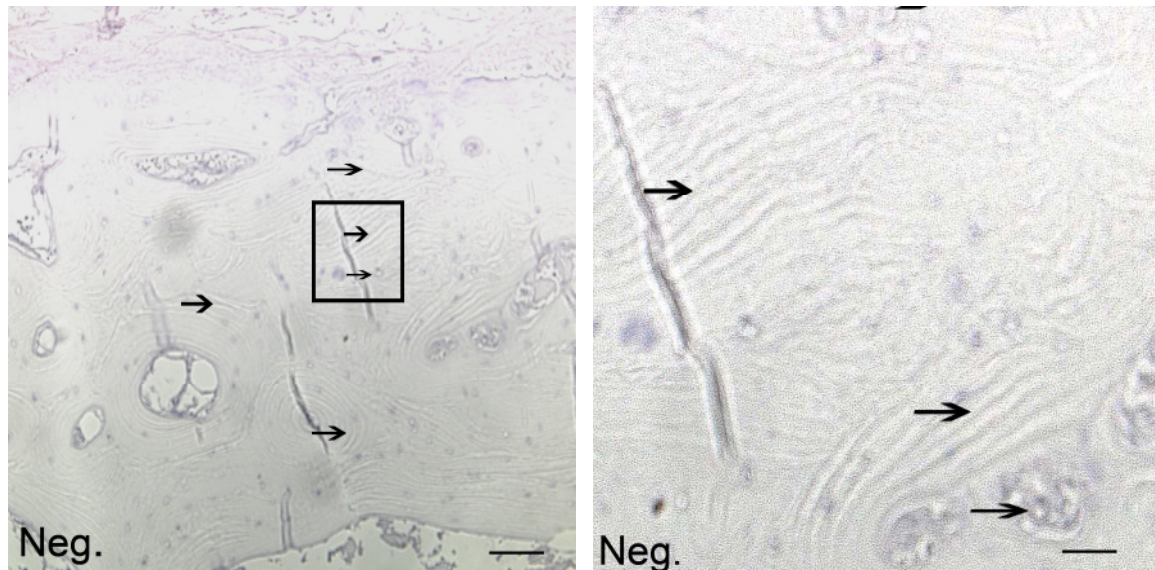


Abbildung 17: kein Nachweis von humanen Beta Defensinen -1, -2 und -3 in einem Kontrollpräparat (=Neg.) der Scapula

Es zeigen sich keinerlei Immunreaktionen.

Die linksseitigen Bilder stellen das Untersuchungsareal mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar wären

3.2.5. Nicht infizierter humaner Fibulaknochen

Die immunhistochemischen Untersuchungen von nicht infiziertem Fibulaknochen zeigten die geringsten Immunreaktionen gegen alle drei Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Vergleich zu den anderen Knochenproben (Abbildung 18, Abbildung 19). Es wurden kleine Immunreaktionen entlang der Gefäßkanäle gefunden. Vereinzelt und sehr unscharf traten bei dem Defensin hBD-3 Immunbanden auch innerhalb der mineralisierten Matrix auf (Abbildung 19). Die Osteozyten zeigten keine Immunreaktionen auf die gesuchten Defensine in allen Fibulaproben.

Die semiquantitative Analyse des Fibulaknochens ergab einen Maximalpunktwert von 3, sowie bei allen untersuchten Präparaten einen Mittelwert von 2,8 (Tabelle 1, Abbildung 20). Die einzelnen Punktwerte der Defensine sind in Tabelle 2 und Abbildung 21 dargestellt.

Die Kontrolle zeigte keine Immunfärbungen gegen alle drei Defensine (Abbildung 19).

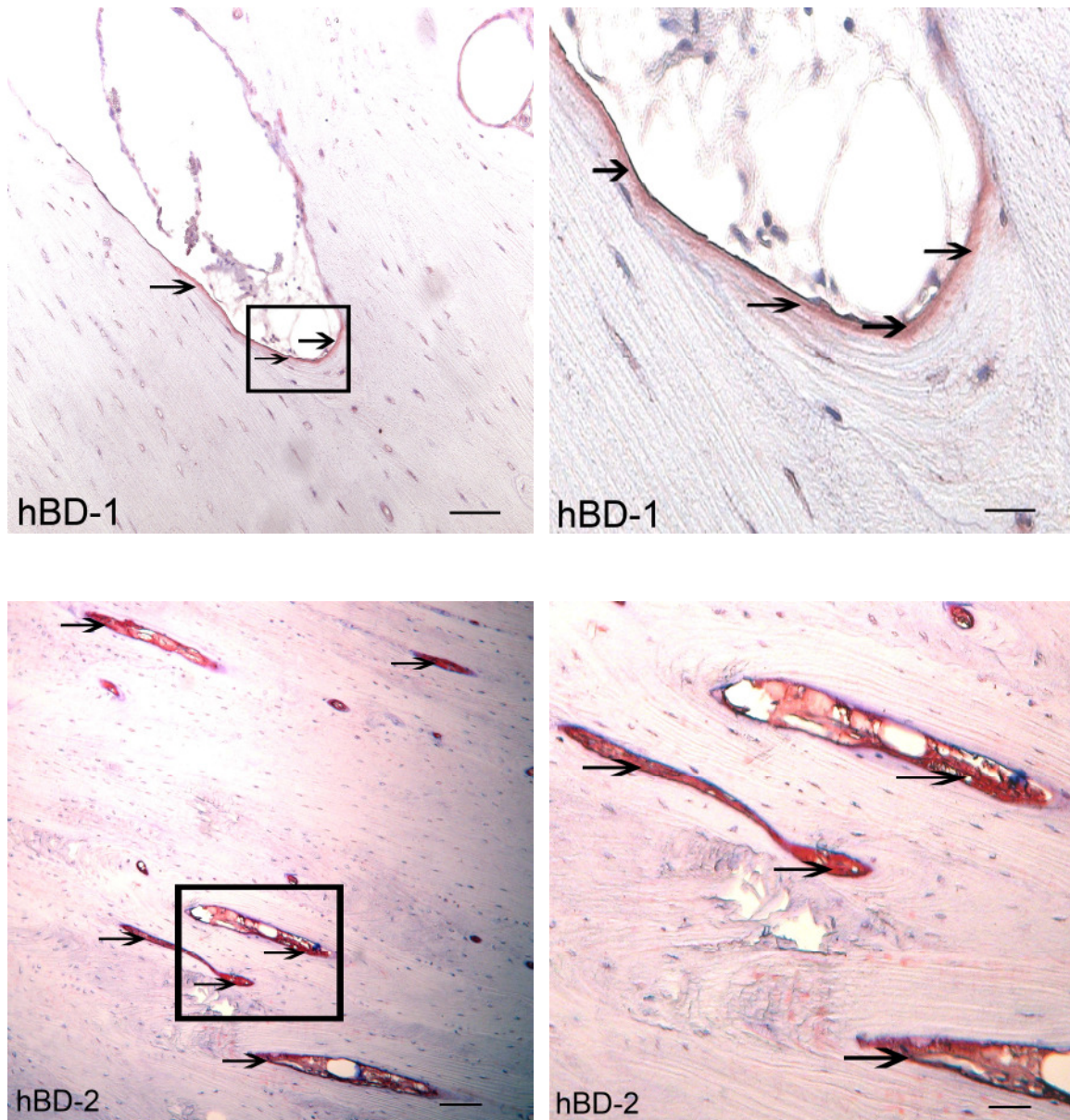


Abbildung 18: Nachweis von humanen Beta Defensinen -1 und -2 in einem nicht infizierten Fibulapräparat

Immunreaktionen (→) zeigen sich bei beiden Beta Defensinen nur schwach entlang des Endosts.

Die linksseitigen Bilder stellen die Defensine mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind

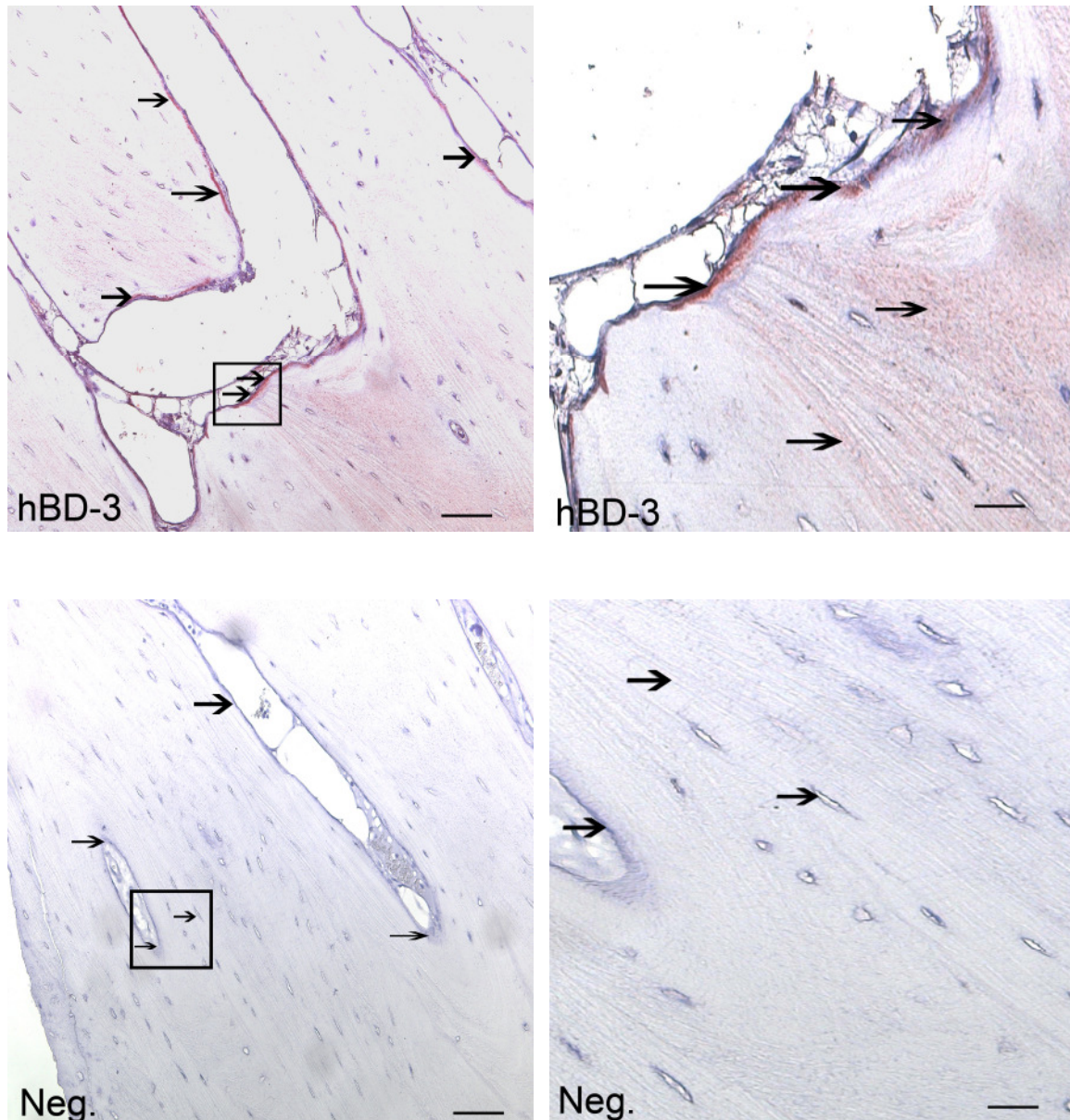


Abbildung 19: Nachweis von humanem Beta Defensin 3 in einem nicht infizierten Fibulapräparat, sowie fehlender Nachweis aller drei Defensine in einem Kontrollpräparat (Neg.)

Immunreaktionen (→) zeigen sich auch bei diesem Beta Defensin nur schwach entlang des Endosts sowie innerhalb der Knochenmatrix.

Die Kontrollpräparate zeigen keine Immunreaktionen (→) auf alle drei Defensine.

Die linksseitigen Bilder stellen die Defensine beziehungsweise das Untersuchungsgebiet mit einer 20fachen Vergrößerung dar (—: entspricht ~ 100 µm)

Die rechtsseitigen Bilder stellen die markierten Ausschnittsvergrößerungen der linksseitigen Bilder dar (—: entspricht ~ 25 µm)

→: markiert Bereiche, in denen die immunhistochemischen Farbreaktionen auf die getesteten Defensine erkennbar sind beziehungsweise erkennbar wären

3.3. Semiquantitative Analyse

Zur Erlangung der Punktwerte wurde, wie bereits erwähnt, eine semiquantitative Analyse durchgeführt. Dabei bekamen die einzelnen Knochenschliffe je nach Häufigkeit des Auftretens und Lokalisation der Defensine Punkte zugeteilt.

Die Punkte (+) für eine eventuelle Immunreaktion wurden wie folgt vergeben:

1 Punkt: Immunreaktion in Osteozyten

1 Punkt: Immunreaktion entlang Endostzellen und Gefäßkanälen.

1 Punkt: Feine Immunbanden in mineralisierter Matrix bis ca. 1-2 Osteozytenbreiten

1 Punkt: Extrapunkt für kräftige, barriereartige Immunbanden in mineralisierter Matrix größer als 2 Osteozytenbreiten.

Anhand dieser Punkte konnte dann die nachfolgende Tabelle 1 erstellt werden.

Knochenprobe	hBD-1	hBD-2	hBD-3	Maximal-punktzahl	Mittelwert aller Schnitte
Unterkieferknochen, infiziert	++++	++++	++++	12	11,4
Unterkieferknochen, nicht infiziert	++	++	+++	7	6,8
Crista iliaca, nicht infiziert	++	+	+++	6	5,8
Scapula, nicht infiziert	+	+	++	4	3,6
Fibula, nicht infiziert	+	+	+	3	2,8

Tabelle 1: Semiquantitative Analyse

Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Knochenschliffe. Es wurden Punktwerte für die Ausprägung der Immunreaktionen vergeben. Infizierter Mandibulaknochen hatte die deutlichsten Immunreaktionen für alle 3 Defensine (maximal möglicher Punktwert: 12)

Neben einer tabellarischen Darstellung der semiquantitativen Analyse wurde auch eine graphische Darstellung erstellt. Dabei wurden neben den Maximalwerten (Tabelle 1) die Mittelwerte aller untersuchten Proben ausgewertet. Sie wiesen

ebenfalls die deutlichste Immunreaktion bei infiziertem Unterkiefer auf. Alle weiteren Präparate zeigten Punktwerte, die den Maximalpunktwerten entsprechen. Die Auswertung der Mittelwerte aus Tabelle 1 wurde in Abbildung 20 wiedergegeben.

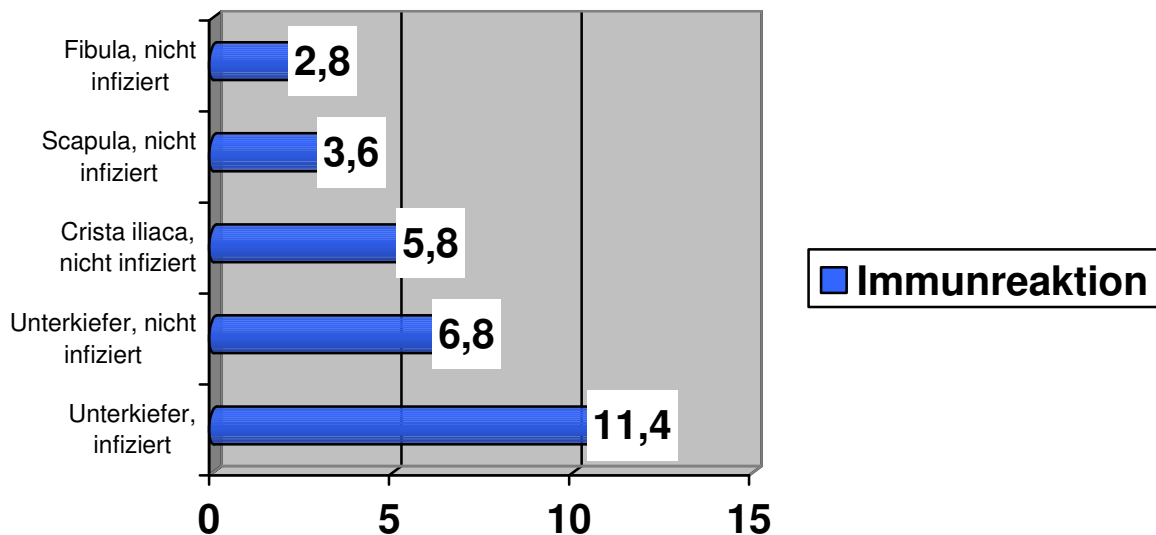


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Immunreaktion

Darstellung der Mittelwerte der immunhistochemischen Untersuchung der Knochenschliffe (Tabelle 1). Es wurden Punktwerte für die Ausprägung der Immunreaktion vergeben (je mehr Immunreaktion, desto mehr antimikrobielle Defensine sind vorhanden). Infizierter Kieferknochen hatte die deutlichsten Immunreaktionen für alle drei humanen Beta Defensine.

Neben der Untersuchung und Wiedergabe aller drei Defensine hBD-1, -2 und -3 wurden auch die einzelnen Mittelwerte von jedem einzelnen Defensin aller untersuchten Präparate ermittelt. Diese Werte sind in Tabelle 2 dargestellt. Eine graphische Darstellung dieser Mittelwerte zeigt die Abbildung 21.

Defensin	Unterkiefer, infiziert	Unterkiefer, nicht infiziert	Crista iliaca, nicht infiziert	Scapula, nicht infiziert	Fibula, nicht infiziert
hBD-1	3,8	2,2	1,8	1,2	1,0
hBD-2	3,6	2,0	1,6	1,0	0,6
hBD-3	4,0	2,6	2,4	1,4	1,2

Tabelle 2: Mittelwerte aller Proben

Darstellung der Mittelwerte aller untersuchten Knochenproben mit möglicher Maximalpunktzahl (4 Punkte) nach der Punktvergabe anhand der semiquantitativen Analyse

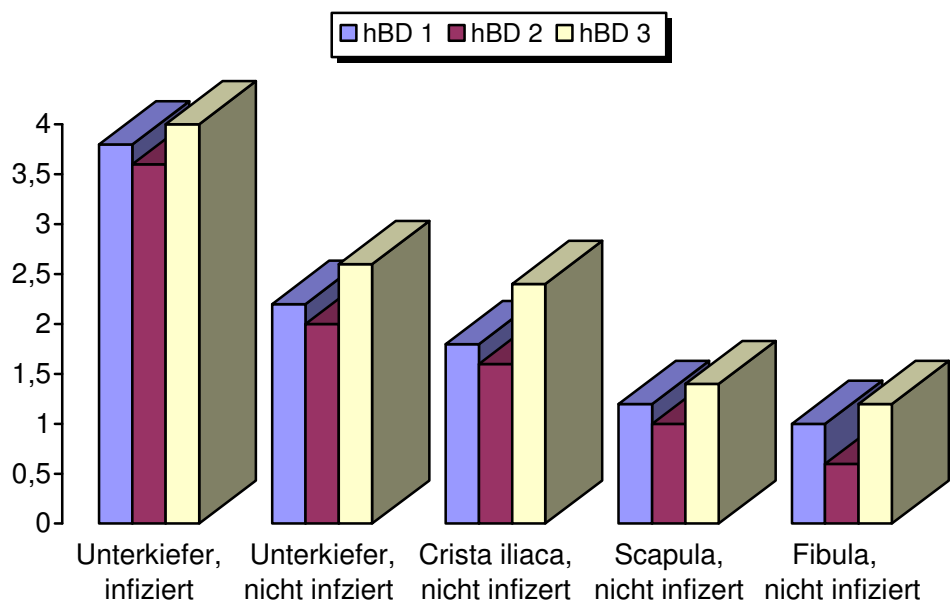


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Mittelwerte aller Proben

Graphische Darstellung der Mittelwerte aller untersuchten Knochenproben mit möglicher Maximalpunktzahl (4 Punkte) nach der Punktvergabe durch die semiquantitative Analyse

4. Diskussion

Diese Studie soll Hinweise zur Lösung einer der grundlegenden Fragen der Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie erbringen: Warum infiziert sich Kieferknochen nur selten, obwohl er bei intraoralen Eingriffen immer mit oraler Flora kontaminiert wird?

Ziel war es, zu untersuchen, ob ein eigenes Immunsystem aus antimikrobiellen Peptiden im Knochen existiert, das einer Invasion von Mikroorganismen entgegenwirkt. Auf den Epithelien der Haut und Schleimhäute sind antimikrobielle Peptide beschrieben worden, die der Grund dafür sein könnten, dass der Organismus trotz kommensaler Flora mit fakultativ pathogenen Keimen nicht von dieser infiziert wird (Dunsche et al. 2001, Dunsche et al. 2002, Zasloff 2002, Boman 2003). Boman postulierte, dass das bekannte adaptive Immunsystem zu langsam und ineffizient sei, um die Masse der kommensalen Flora mit einer 20minütigen Verdopplungszeit erfolgreich abzuwehren. Antimikrobielle Peptide hingegen zerstören Bakterienmembranen direkt, ohne zeitaufwendige Phagozytoseprozesse (Zasloff 2002), wofür nur geringste Konzentrationen im nanomolaren Bereich notwendig sind (Boman 2003). Solch ein Abwehrsystem mit einer Barrierefunktion von antimikrobiellen Peptiden wäre ideal für den oralen Knochen.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei den humanen Beta-Defensinen hBD-1, hBD-2 und hBD-3 um antimikrobielle Peptide (J. Harder et al. 1997 b, Dunsche et al. 2002). Das Defensin hBD-1 wurde als erstes Defensin in Hämo-Dialysefiltraten isoliert und anschließend im Urogenitaltrakt, in Speicheldrüsen- sowie Haut- u. Schleimhautepithelien nachgewiesen (Bensch 1995, J. Harder et al. 1997 b, Ganz 1999). Das humane Beta Defensin hBD-2 wurde von psoriatischen Plaques isoliert (J. Harder et al. 1997 a, J. Harder et al. 1997 b,). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass humane Beta-Defensine bei inflammatorischen Prozessen vermehrt auftreten. Dies gilt allerdings nur für hBD-2 und hBD-3. Diese beiden konnten signifikant durch Bakterienkontakt und dadurch auftretende Zytokine, wie die Interleukine IL-6, IL-8, IL-10, des Tumornekrosefaktors α (TNF α) sowie durch das γ -Interferon, hochreguliert werden (Mathews et al. 1999, Krisanaprakornkit et al. 2000, J. R. Garcia et al. 2001 a, J. Harder et al. 2001, Krisanaprakornkit et al. 2002, Joly et al.

2004, Boniotto et al. 2006). Das hBD-3 hat dabei allerdings eine höhere Anti-Staphylokokken Wirksamkeit als hBD-2 (Schibli et al. 2002, J. Harder et al. 2004).

Die vorliegende Studie beweist erstmals, dass eine Peptidbarriere, bestehend aus den humanen Defensinen hBD-1, -2 und -3, im Knochen gebildet werden kann. Dies kann die geringe Rate von Infektionen im Kieferknochen nach chirurgischen Eingriffen erklären. Diese These wird durch eine Studie der Arbeitsgruppe um Teltzrow belegt. Dabei wurde gezeigt, dass von circa 1264 Patienten, die sich einer bilateralen Osteotomie unterzogen, nur 0,2% (n=2) der untersuchten Personen eine Osteomyelitis aufwiesen (Teltzrow et al. 2005). Auch bei circa 1000 Patienten mit einer zuvor durchgeführten LeFort I Osteotomie zeigte sich, dass es in nur 6,4% der Fälle zu einer Infektion kam. Keiner dieser 1000 Patienten litt an einer postoperativen Osteomyelitis (Kramer et al. 2004).

Des Weiteren erklärt die hier durchgeführte Studie auch das Ausbleiben einer Infektion im Rahmen der ersten und zweiten Dentition. Ebenfalls könnte eine antimikrobielle Peptidbarriere ursächlich dafür sein, dass chronische apikale Infektionen devitaler Zähne über lange Zeiträume örtlich begrenzt und unauffällig bleiben. Erst durch eine Störung der Barrierefunktion, oder wenn diese Funktion nicht mehr ausreichend ist, entwickelt sich aus dem apikalen Granulom ein odontogener Abszess.

In nicht infiziertem Kieferknochen wurde vornehmlich hBD-3 innerhalb der Knochenmatrix, entlang des Endosts und entlang von Gefäßkanälen gefunden. Die Defensine hBD-1 und -2 wurden ebenso detektiert, waren aber weniger klar immunhistochemisch definiert. Ein Punktwert von 7 wurde in der semiquantitativen Analyse (Tabelle 1, Abbildung 20, Abbildung 21) erreicht. Im Vergleich dazu, war die Expression aller drei Defensine im chronisch infizierten Kieferknochen am deutlichsten von allen Knochenproben (Punktwert 12; Tabelle 1, Abbildung 20, Abbildung 21). Das humane Beta Defensin hBD-3 war wieder am stärksten vertreten. Kieferknochen kann sich infizieren, insbesondere dann, wenn dieser durch vorangegangene Irradiatio kompromittiert wurde. Es wurden unter anderem frisch blutende, vitale Knochenproben im Kontaktbereich zur Osteoradionekrose genommen. Hier wurden maximale Abwehraktivitäten des Knochens vermutet. In der Tat stellten sich ausgeprägte Banden von hBD-1, -2, -3 unterhalb des Endosts in der

Knochenmatrix dar. Dies ist sinnvoll, da der Grenzbereich zwischen Knochenmark und Knochenmatrix den Invasionsort der Bakterien darstellt. Die offensichtlich verstärkte Expression der drei Defensine im infizierten Kieferknochen im Vergleich zum nicht infizierten Kieferknochen kann Anhalt dafür sein, dass eine Hochregulation der Defensinexpression im Knochen möglich ist. Passend dazu war in nicht infizierter Fibula (Punktwert 3) und nicht infizierter Scapula (Punktwert 4) nur wenig Defensinexpression immunhistochemisch nachweisbar (Tabelle 1, Abbildung 20, Abbildung 21). Das hBD-3 war auch hier wieder am stärksten immunhistochemisch aufzufinden. Beide skelettalen Lokalisationen sind durch Weichgewebmassen vor kommensaler Flora geschützt. Dies erklärt vermutlich das geringe Auftreten der Defensine in diesen Bereichen. In nicht infiziertem Beckenkammknochen waren unerwartet deutliche Immunreaktionen zu verzeichnen (Punktwert 6), die aber geringer als in nicht infiziertem Kieferknochen waren (Punktwert 7). Beckenknochen hat hohe regenerative Potenz und kann in großen Mengen zum Unterkieferersatz oder zur Kieferaugmentation problemlos frei transplantiert werden (Warnke et al. 2004). Der Unterkiefer hat durch das vergleichbare dünne Mukoperiost mit aufgelagerter kommensaler Flora und die ständige bakterielle Präsenz im Parodont eine höhere Wahrscheinlichkeit, Induktionsmechanismen zur Defensinexpression erfahren zu haben. Eine exakte qualitative Auswertung der genauen Peptidexpression soll in zukünftigen Studien entwickelt werden.

Die Expression aller drei Defensine wurde ebenfalls immunhistochemisch innerhalb der Osteozyten selbst detektiert. Dies kann ein Hinweis auf eine immunologische Funktion von Osteozyten sein. Varoga et al. bestätigen unsere Resultate darüber hinaus, indem sie beschreiben, dass innerhalb kürzester Zeit die Expression von hBD-3 innerhalb der Osteozyten unter Bakterienbefall ansteigt (Varoga et al. 2009). Diese Beobachtungen trafen laut der Gruppe um Varoga allerdings nur auf akute Knocheninfektionen zu. Nicht nachgewiesen werden konnte ein Anstieg der hBD-3 Sekretion bei chronisch infiziertem Knochen (Varoga et al. 2009).

Allerdings lässt der immunhistochemische Nachweis alleine nicht zu, den Osteozyten selbst die Defensinproduktion zuzuordnen. In der Arbeitsgruppe um Varoga wurde nachgewiesen, dass der schnelle Anstieg von hBD-3 innerhalb der Osteozyten bei einer Infektion nicht auf einer gesteigerten Biosynthese von hBD-3 beruht, sondern

eher auf einer gesteigerten Sekretion von gespeicherten, vorgeformten humanen Beta Defensinen 3 innerhalb der Osteozyten (Varoga et al. 2009).

Theoretisch könnte die Sekretion von humanen Beta Defensinen -1 und -2 auch auf diese Art bei einer Infektion ansteigen, oder aber sie werden von endostalen Zellen produziert und per Endozytose von den Osteozyten aufgenommen. Dieser Prozess der Peptidaufnahme durch Endozytose wurde für Alpha-Defensine aus dem Bereich des adaptiven Immunsystems beschrieben (Zaharatos et al. 2004). Zurzeit werden diese Theorien noch untersucht, und sind bisher noch nicht näher beschrieben worden.

Es wurde nachgewiesen, dass es wenige Bakterien wie beispielsweise *Treponema denticola* gibt, die resistent gegen Defensine sind (Schultz et al. 1998). Dies tritt auf, wenn Lipopolysaccharide an der äußeren Zellmembran fehlen. Zusätzlich wurde beschrieben, dass immunsuppressive Medikamente, wie beispielsweise Glukocortikoide, die Expression der antimikrobiellen Peptide verringern. Andere Studien bewiesen aber auch, dass die Defensine gegen eine Überzahl der sich im Körper befindlichen Bakterien, egal ob aerob oder anaerob, wirksam sind (Joly et al. 2004). Daher ist davon auszugehen, dass die Defensine gegen die im Knochen vorhandenen Keime wirksam sind.

Zukünftige Studien sollten sich darauf konzentrieren, den Mechanismus und die verantwortlichen Zytokine zu identifizieren, die die Induktion der Beta-Defensinbildung verursachen. Lokale Applikation oder Induktion von antimikrobiellen Peptiden im Gewebe kann neue Therapieansätze bei der Infektionsprophylaxe für die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Parodontologie bieten.

In der Orthopädie treten viele postoperative Infektionen trotz perioperativer systemischer Antibiosen auf (Suttorp et al. 2003). Der Antibiotikeinsatz ist hier hoch und Antibiotikaresistenzentwicklungen stellen ein großes Problem dar (Giulieri et al. 2004). Des Weiteren zeigte eine Studie von Delong et al., dass von 127 offenen Frakturen, die zwar innerhalb von 24 Stunden therapiert wurden, es trotzdem bei 7% der Patienten zu einer Osteomyelitis kam (DeLong et al. 1999). Ursache dafür könnten unter anderem die in dieser Studie gezeigten geringen Mengen an Beta Defensinen sein.

Da die humanen Beta-Defensine, zwar nur in geringen Mengen, aber auch in skelettalen Lokalisationen außerhalb des Kieferknochens gefunden wurden, könnten die Induktionsmechanismen der Beta Defensine auch in der orthopädischen Chirurgie oder Unfallchirurgie Verwendung finden. Weitere denkbare Optionen für die Anwendung von antimikrobiellen Peptiden wären Implantatbeschichtungen mit humanen Defensinen, um Einheilungen zu verbessern und Knochenverlust durch periimplantäre Infektionen zu minimieren. Da es sich hierbei um biologische, körpereigene lokale „Antibiotika“ ohne bekannte Resistenzen oder systemische Nebenwirkungen handelt, ist eine hohe Akzeptanz durch den Organismus des Patienten zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Warum führen Osteosynthesen, Materialentfernungen oder einfache oralchirurgische Eingriffe auch ohne antibiotische Prophylaxe nur selten zu Infektionen, obwohl der Kieferknochen immer mit Mundhöhlenflora kontaminiert ist? Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchung war es, zu prüfen, ob im Knochen ein eigenes, bisher unbekanntes Immunsystem, basierend auf antimikrobiellen Peptiden, existiert. Beta-Defensine sind solche antimikrobiellen Peptide. Sie wurden zuvor schon auf Haut- und Schleimhäuten des Menschen beschrieben und können kommensale sowie pathogene Flora abwehren.

Es wurden fünf Knochenbiopsien von humanem, infiziertem Kieferknochen mit Biopsien von jeweils fünf humanem, nicht infiziertem Kieferknochen, nicht infiziertem Crista iliaca Knochen, nicht infiziertem Scapulaknochen sowie nicht infiziertem Fibulaknochen verglichen. Immunhistochemische Färbungen wurden gegen die antimikrobiell wirksamen humanen Beta-Defensine -1, -2, und -3 durchgeführt.

Semiquantitative Analysen der Immunreaktionen wurden durchgeführt, bei der maximale Punktwerte von 12 erreicht werden konnten. Die einzelnen Knochenschliffe bekamen dabei je nach Häufigkeit des Auftretens und der Lokalisation der humanen Beta Defensine Punkte zugeteilt. Niedrige Punktwerte deuteten auf eine niedrige Defensinkonzentration hin, während hohe Punktwerte auf eine hohe Konzentration der humanen Beta Defensine hinwiesen.

Alle drei humanen Beta-Defensine wurden in Kieferknochen innerhalb der mineralisierten Matrix, aber auch in den Osteozyten gefunden. In den weiteren skelettalen Knochenproben ist die Expression vorhanden, allerdings geringer. Dies würde erklären, warum Infektionen bei Extremitätenfrakturen nur schwer zu beherrschen sind. Die gesteigerte Expression der Defensine im Kieferknochen würde die geringe Infektionsrate bei chirurgischen Eingriffen in der Mund, Kiefer- und Gesichtschirurgie erklären.

Diese Studie weist eine bisher unbekannte immunologische Funktion von Osteozyten in Form eines antimikrobiellen peptidbasierenden Immunsystem im Knochen nach.

Die anscheinend mögliche Induktion der Peptidexpression öffnet neue Forschungsansätze für eine zukünftige therapeutische Nutzung der Peptide in der Infektionsprophylaxe bei traumatologischen Eingriffen.

6. Literaturverzeichnis

Artico, M., Ferrante, L., Pastore, F.S., Ramundo, E.O., Cantarelli, D., Scopelliti, D., Iannetti, G. (2003): Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature. *Surg Neurol*, 60, 71-79

Bensch, K.W., Raida, M., Magert, H.J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W.G. (1995): HBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*, 368, 331-335

Boman, H.G. (2003): Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 254, 197-215

Boman, H.G., Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y., Lidholm, D.A. (1991): Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem.*, 201, 23-31

Boniotto, M., Jordan, W.J., Eskdale, J., Tossi, A., Antcheva, N., Crovella, S., Connell, N.D., Gallagher, G. (2006): Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1433-1441

Brånemark, P.I. (1985): Einführung in die Osseointegration. in: Brånemark, P.I., Zarb, G., Albrektsson, T.: *Gewebeintegrierter Zahnersatz*; Quintessenz, Berlin

Cowland, J.B., Johnsen, A.H., Borregaard, N. (1995): HCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett*, 368, 173-176

Davies, J.E. (1998): Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*, 11, 391-401

DeLong, W.G. Jr, Born, C.T., Wei, S.Y., Petrik, M.E., Ponzio, R., Schwab, C.W. (1999): Aggressive treatment of 119 open fracture wounds. *J Trauma*, 46, 1049-1054

Duits, L.A., Rademaker, M., Ravensbergen, B., Van Sterkenburg, M.A., van Strijen, E., Hiemstra, P.S., Nibbering, P.H. (2001): Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 522-525

Dunsche, A., Acil, Y., Siebert, R., Harder, J., Schröder, J.M., Jepsen, S. (2001): Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med*, 30, 154-158

Dunsche, A., Acil, Y., Dommisch, H., Siebert, R., Schröder, J.M., Jepsen, S. (2002): The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci*, 110, 121-124

Epand, R.M., Vogel, H.J. (1999): Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.*, 1462, 11-28

Fulton, C., Anderson, G.M., Zasloff, M., Bull, R., Quinn, A.G. (1997): Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet*, 350, 1750–1751

Ganz, T. (1999): Defensins and host defense. *Science*, 286, 420–421

Garcia, J.R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodríguez-Jiménez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.G., Bals, R. (2001) a: Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 306, 257–264

Garcia, J.R., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F.J., Kluver, E., Adermann, A., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., Forssmann, W.G. (2001) b: Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, 15, 1819–1821

Giulieri, S.G., Graber, P., Ochsner, P.E., Zimmerli, W. (2004): Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection*, 32, 222–228

Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., Wilson, J.M. (1997): Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88, 553–560

Gropp, R., Frye, M., Wagner, T.O., Bargon, J. (1999): Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther*, 10, 957–964

Halling, F., Merten, H.A. (1992): The bacteriological and clinical aspects of odontogenic soft-tissue infections. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl.*, 80, 281–286

Harder, J., Siebert, R., Zhang, Y., Matthiesen, P., Christophers, E., Schlegelberger, B., Schröder, J.M. (1997) a: Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, 46, 472–475

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M. (1997) b: A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M. (2001): Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276, 5707–5713

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J.M. (2004): Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol*, 123, 522–529

Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J.J., Chertov, O., Lubkowski, J. (2000): The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem*, 275, 32911–32918

- Hoover, D.M., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W., Lubkowski, J. (2003): Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 2804-2809
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)- deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol*, 162, 3749-3752
- Joly, S., Maze, C., McCray, P.B. Jr., Guthmiller, J.M. (2004): Human beta defensins 2 and 3 demonstrate strain selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol*, 42, 1024-1029
- Kikuchi, K., Kusama, K., Taguchi, K., Ishikawa, F., Okamoto, M., Shimada, J., Sakashita, H., Yamamoto, Y. (2002): Dendritic cells in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer Res*, 22, 545-557
- Kramer, F.J., Baethge, C., Swennen, G., Teltzrow, T., Schulze, A., Berten, J., Brachvogel, P. (2004): Intra- and perioperative complications of the LeFort I osteotomy: a prospective evaluation of 1000 patients. *J Craniofac Surg*, 15, 971-977
- Krisanaprakornkit, S., Kimball, J.R., Weinberg, A., Darveau, R.P., Bainbridge, B.W., Dale, B.A. (2000): Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun*, 68, 2907–2915
- Krisanaprakornkit, S., Kimball, J.R., Dale, B.A. (2002): Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol*, 168, 316–324
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R., Eisenhauer, P. (1991): Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods*, 137, 167-173
- Lehrer, R.I., Ganz, T. (1996): Endogenous vertebrate antibiotics: defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann N Y Acad Sci*, 797, 228-239
- Lehrer, R.I. (2004): Primate Defensins. *Nat Rev Microbiol*, 2, 727-738
- Linzmeier, R., Ho, C.H., Hoang, B.V., Ganz, T. (1999): A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene*, 233, 205-211
- Liu, A.Y., Destoumieux, D., Wong, A.V., Park, C.H., Valore, E.V., Liu, L., Ganz, T. (2002): Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol*, 118, 275-281

Mathews, M., Jia, H.P., Guthmiller, J.M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G.K., Tack, B.F., McCray, P.B. Jr. (1999): Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun*, 67, 2740–2745

Midorikawa, K., Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Fujiwara, T., Yamazaki, K., Sayama, K., Taubman, M.A., Kurihara, H., Hashimoto, K., Sugai, M. (2003): Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun*, 71, 3730–3739

Müller, H.P. (2006): Checkliste Zahnmedizin, Parodontologie. Thieme Verlag, Stuttgart

O’Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., Kagnoff, M.F. (1999): Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 163, 6718–6724

Ouellette, A.J., Selsted, M.E. (1996): Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J*, 10, 1280–1289

Quayle, A.J., Porter, E.M., Nussbaum, A.A., Wang, Y.M., Brabec, C., Yip, K.P., Mok, S.C. (1998): Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 152, 1247–1258

Schibli, D.J., Hunter, H.N., Aseyev, V., Starner, T.D., Wiencek, J.M., McCray, P.B. Jr, Tack, B.F., Vogel, H.J. (2002): The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus. *J Biol Chem*, 277, 8279–8289

Schultz, C.P., Wolf, V., Lange, R., Mertens, E., Wecke, J., Naumann, D., Zähringer, U. (1998): Evidence for a new type of outer membrane lipid in oral spirochete Treponema denticola. Functioning permeation barrier without lipopolysaccharides. *J Biol Chem*, 273, 15661–15666

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C.J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274, 17406–17409

Selsted, M.E., Harwig, S.S., Ganz, T., Schilling, J.W., Lehrer, R.I. (1985): Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*, 76, 1436–1439

Selsted, M.E., Tang, Y.Q., Morris, W.L., McGuire, P.A., Novotny, M.J., Smith, W., Henschen, A.H., Cullor, J.S. (1993): Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta- defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem*, 268, 6641–6648

Selsted, M.E. (2004): Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr Protein Pept Sci*, 5, 365–371

Shai, Y. (2002): Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 66, 236–248

- Singh, P.K., Jia, H.P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B.A., Greenberg, E.P., Valore, E.V., Welsh, M.J., Ganz, T., Tack, B.F., McCray, P.B. Jr (1998): Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 14961–14966
- Springer, I.N., Suhr, M., Fleiner, B. (2002): Adaptive adjustment of the adolescent porcine mandibular condyle. *Bone*, 31, 230-235
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246-248
- Suttorp, N., Kiehl, W., Mielke, M., Stück, B. (2003): *Infektionskrankheiten: Verstehen, erkennen, behandeln*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Teltzrow, T., Kramer, F.J., Schulze, A., Baethge, C., Brachvogel, P. (2005): Perioperative complications following sagittal split osteotomy of the mandible. *J Craniomaxillofac Surg*, 33, 307-313
- Tossi, A. (2002), Antimicrobial Sequences Database (AMSDb), <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>
- Valore, E.V., Park, C.H., Quayle, A.J., Wiles, K.R., McCray, P.B. Jr., Ganz, T. (1998): Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 101, 1633–1642
- Varoga, D., Pufe, T., Harder, J., Schröder, J.M., Mentlein, R., Meyer-Hoffert, U., Goldring, M., Tillmann, B., Hassenpflug, J., Paulsen, F. (2005): Human beta-defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis Rheum*, 52, 1736-1745
- Varoga, D., Tohidnezhad, M., Paulsen, F., Wruck, C.J., Brandenburg, L., Mentlein, R., Lippross, S., Hassenpflug, J., Besch, L., Müller, M., Jürgens, C., Seekamp, A., Schmitt, L., Pufe, T. (2008): The role of human beta-defensin-2 in bone. *J Anat*, 213, 749-757
- Varoga, D., Wruck, C.J., Tohidnezhad, M., Brandenburg, L., Paulsen, F., Mentlein, R., Seekamp, A., Besch, L., Pufe, T. (2009): Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. *Histochem Cell Biol*, 131, 207-218
- Wang, Z., Wang, G. (2004): APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res*, 32, 590-592
- Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2009): APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*, 37, 933-937.
- Wang, X., Zhang, Z., Louboutin, J.P., Moser, C., Weiner, D.J., Wilson, J.M. (2003): Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J*, 17, 1727-1729

Warnke, P.H., Springer, I.N., Wiltfang, J. Acil, Y., Eufinger, H., Wehmöller, M., Russo, P.A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., Terheyden, H. (2004): Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*, 364, 766-770

Wimley, W.C., Selsted, M.E., White, S.H. (1994): Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*, 3, 1362-1373

Yamaguchi, Y., Nagase, T., Makita, R., Fukuhara, S., Tomita, T., Tominaga, T., Kurihara, H., Ouchi, Y. (2002): Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol*, 169, 2516-2523

Yang, D., Chertov, O., Oppenheim, J.J. (2001): Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol*, 69, 691-697

Zhao, C., Wang, I., Lehrer, R.I. (1996): Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*, 396, 319-322

Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395

Zaharatos, G.J., He, T., Lopez, P., Yu, W., Yu, J., Zhang, L. (2004): Alpha-defensins released into stimulated CD8+ T-cell supernatants are likely derived from residual granulocytes within the irradiated allogeneic peripheral blood mononuclear cells used as feeders. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 36, 993-1005

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Patrick Warnke für die Überlassung des Themas, für die Betreuung während der Konzeption der Arbeit, sowie die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Yahya Açı für die Überlassung der benötigten Räumlichkeiten und Materialien, sowie bei seinen Mitarbeiterinnen Frau Gisela Otto und Frau Gabriele Neßenius für die wertvolle fachliche Unterstützung und fortwährende Hilfe während der Untersuchungen.

Bei Herrn Dr. Markus Kosmahl bedanke ich mich für die Herstellung der Präparate.

Mein Dank gilt auch Herrn Martin Hopfenziz für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Von Herzen danke ich meiner Familie und Stephan Porsch.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Däbel

Vorname: Sylvana

Geburtsdatum: 06.10.1981

Geburtsort: Kyritz, Brandenburg

Familienstand: ledig

Eltern: Lutz Däbel, Diplomingenieur
Carola Däbel, Bilanzbuchhalterin

Geschwister: Aderita Däbel, 23 Jahre alt, Diplom Kauffrau

Schulbildung

1988 – 1994 Grundschule in Wittstock

1994 – 2001 Gymnasium in Wittstock, Abschluss Abitur

1998 – 1999 11. Schuljahr als Austauschschülerin in Newberry,
South Carolina, USA

Hochschulbildung

2001 – 03/2002 Studium der Molekularen Biotechnologie an der Universität zu
Lübeck

04/2002 – 2008 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

02 – 04/2007 Zahnärztliche Famulatur auf den Cook Islands

Juni 2008 Zahnärztliche Approbation